

Cristhyane Garcia Araldi

**REGULAÇÃO DOS MECANISMOS FISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA GERMINAÇÃO E
CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia***

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Doutor em Ciências
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cileide Maria
Medeiros Coelho

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Araldi, Cristhyane Garcia
Regulação dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos
envolvidos na germinação e conservação de sementes de
Araucaria angustifolia / Cristhyane Garcia Araldi ;
orientadora, Cileide Maria Medeiros Coelho - Florianópolis,
SC, 2016.
108 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Araucaria
angustifolia*. 3. Sementes recalcitrantes. 4. Metabolismo
de reservas. 5. Atividade antioxidante enzimática. I.
Coelho, Cileide Maria Medeiros. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto de muito trabalho e só foi possível chegar até aqui por que contei com o apoio e cooperação de instituições, pesquisadores, familiares e amigos. Chegou a hora de agradecer-los.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por todas as bênçãos recebidas, por me dar a oportunidade de realizar este trabalho, me fortalecendo dia após dia. Ao meu esposo Rafael, por todo o amor, carinho, incentivo, parceria e principalmente compreensão ao longo desta jornada. Aos meus pais pelo incentivo e por me ensinarem a ser persistente e a ter fé.

Agradeço também à minha orientadora professora Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho em quem eu busco inspiração, por todos os ensinamentos durante esta caminhada, por sua compreensão e amizade.

Aos pesquisadores da USP/ESALQ, professor Dr. Ricardo Antunes Azevedo e Dra. Salete Aparecida Gaziola, pelo imenso aprendizado que me proporcionaram.

A todos os professores do RGV por tantos ensinamentos durante esses anos de profundo crescimento. Aos professores da banca que gentilmente aceitaram contribuir com este trabalho.

Agradeço à querida secretária do RGV Bernadete Ribas, por sempre me dar uma força sem tamanho, por sua paciência e carinho.

Aos amigos dos laboratórios de Sementes da UFSC e Análise de Sementes da UDESC, por fazerem parte deste ciclo tão especial da minha vida, por toda ajuda, parceria, incentivo e por fazer meus dias serem ainda mais felizes. Todos vocês terão um pedacinho do meu coração para sempre.

A toda a equipe do laboratório de Genética Bioquímica de Plantas da USP/ESALQ, pelos ensinamentos compartilhados.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de crescimento profissional e humano.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV) e Universidade de São Paulo (ESALQ) por permitirem a realização de parte deste trabalho.

À FAPESC pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

Recebam a minha gratidão!

“That which is impenetrable to us really exists. Behind the secrets of nature remains something subtle, intangible, and inexplicable. Veneration for this force beyond anything that we can comprehend is my religion.”

(Albert Einstein, 1879-1955)

REGULAÇÃO DOS MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *Araucaria angustifolia*

RESUMO

Sementes de *Araucaria angustifolia* são colhidas com alto grau de umidade e seu metabolismo se mantém elevado durante o armazenamento. Visando à conservação da espécie, esta pesquisa buscou caracterizar eventos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na perda de viabilidade e início precoce do metabolismo germinativo que ocorre em sementes de *A. angustifolia* após a colheita. As sementes foram coletadas em 2012, em duas populações de Santa Catarina e armazenadas em condição de ambiente de laboratório sem controle térmico e em câmara fria (temperatura de $10 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $45 \pm 5\%$). Para o estudo, avaliou-se o potencial de uso do teste de pH do exsudato visando obter um método rápido e eficiente para a avaliação da viabilidade das sementes; a qualidade fisiológica durante o armazenamento, observando-se a ocorrência da germinação sob armazenamento, uma consequência do metabolismo típico de sementes recalcitrantes, sendo as sementes classificadas em relação às “categorias de desenvolvimento precoce”; o comportamento de sementes de diferentes variedades quanto à manutenção da qualidade fisiológica durante o armazenamento; a análise da hidrólise e mobilização de reservas no armazenamento de curto prazo e em função das categorias de desenvolvimento precoce; e a ocorrência do estresse oxidativo e ativação dos sistemas enzimáticos antioxidantes no embrião em função do armazenamento. Os resultados observados indicaram que o teste do pH do exsudato é eficiente para estimar de forma rápida a viabilidade de sementes, inclusive aquelas em avançado estágio de deterioração, devendo ser realizado em embriões excisados e embebidos em água destilada pelo período de 30 minutos. Além disso, observou-se que o início do processo de germinação precoce pode ser observado cerca de 30 dias após a coleta das sementes, coincidindo com o início da redução da viabilidade. A condição de câmara fria retardou o processo germinativo e formação das plântulas, mas não houve grandes diferenças quanto à manutenção da viabilidade das sementes em relação às condições de armazenamento. Dentre as variedades avaliadas, a variedade “*angustifolia*” apresentou maior vigor e maior potencial de armazenamento em relação às demais. Alterações expressivas nos teores de metabólitos de reserva foram observadas nos primeiros três meses de

armazenamento das sementes, e ocorreram tanto em embriões quanto em megagametófitos. Em função do armazenamento houve redução no conteúdo de açúcares solúveis, amido e proteínas, mas durante a germinação precoce as alterações foram ainda mais expressivas, sendo observada uma redução no teor de aminoácidos e na intensidade e número de bandas do perfil proteico em embriões e megagametófitos. A mobilização das reservas durante a germinação teve início nos embriões, e as proteínas solúveis foram os primeiros componentes mobilizados para a formação das estruturas da plântula. Níveis elevados de H_2O_2 foram observados em sementes recém-colhidas, o que rapidamente induziu a atividade dos sistemas enzimáticos de proteção antioxidante, com elevação na atividade das enzimas APX, CAT e SOD durante 90 dias de armazenamento. Foram identificadas sete isoenzimas SOD nos embriões, e todas elas apresentaram aumento da atividade em resposta ao armazenamento. A peroxidação de lipídios e degradação de proteínas, consequências severas associadas à deterioração em sementes, foram observadas já nos primeiros três meses de armazenamento. Estes resultados permitem concluir que conforme ocorre o avanço da germinação, os embriões se tornam cada vez mais suscetíveis à deterioração. Por isso, acredita-se que a heterogeneidade no grau de maturação pode ser uma das principais causas de deterioração em sementes de *A. angustifolia*. Sugere-se ainda que as alterações nos metabólitos de reserva são baseadas no próprio metabolismo da semente para fornecer energia para os processos germinativos, caracterizando o contínuo metabólico existente nestas sementes, em oposição ao comportamento das sementes ortodoxas. Os danos bioquímicos ao metabolismo ocorreram antes da perda total de viabilidade e não são devidos a falhas nos mecanismos enzimáticos de proteção que responderam prontamente. As informações aqui geradas podem contribuir para elucidar pontos ainda incompreendidos sobre o metabolismo pós-colheita de sementes recalcitrantes.

Palavras-chave: *Araucaria angustifolia*. Conservação de sementes. Sementes recalcitrantes. Metabolismo de reservas. Atividade antioxidante enzimática.

ABSTRACT

Seeds of *Araucaria angustifolia* are harvested with high moisture content and their metabolism remains high during storage. For species conservation, this study aimed to characterize physiological and biochemical events involved in the viability loss and early initiation of germination metabolism that occurs in *A. angustifolia* seeds after harvest. Seeds were collected in 2012, from two populations in Santa Catarina and stored for 270 days under in the natural laboratory environment and in a cold chamber (temperature of 10 ± 3 ° C and relative humidity of $45 \pm 5\%$). The potential use of pH exudate test to obtain a quick and efficient method for assessing the seed viability; the physiological quality during the storage, observing the occurrence of germination in storage, a consequence of the typical metabolism of recalcitrant seeds, and classifying them in relation to “early developmental categories”; the behavior of different varieties of seeds for the maintenance of physiological quality during storage; the analysis of hydrolysis and mobilization of reserves in the short-term storage and according to early developmental categories; and the occurrence of oxidative stress and activation of antioxidant enzyme systems in the embryo as a function of storage. The results indicated that pH exudate test is efficient to quickly estimate the seed viability including those at an advanced stage of deterioration, and it must be performed on excised embryos soaked in distilled water for 30 minutes. Furthermore, it was observed that onset of early germination process can be observed approximately 30 days after seed harvest, coinciding with the start of the viability reduction. The cold chamber condition delayed the germination and seedling formation, but the storage conditions did not differ regarding the maintenance of seed. Among the seed varieties tested, the variety “*angustifolia*” showed the higher vigor and storage potential compared to the others. Expressive changes in reserve metabolites were observed in the first three months of seed storage, and occurred both in embryos and in megagametophytes. There was a reduction in soluble sugars, starch and protein contents as a function of storage, but the changes were even more significant during early germination, being also possible to observe a reduction in amino acid content and in the intensity and number of bands on protein profile from embryos and megagametophytes. Reserve mobilization during germination began in the embryo, and soluble proteins were the first components mobilized to seedling structures formation. High H_2O_2 levels were observed in freshly harvested seeds, which quickly activated the enzyme systems of

protection, with an increase in APX, SOD, and CAT activities during short-term storage. Seven SOD isoenzymes were identified in embryos, and all of them showed increased activity in response to storage. Lipid peroxidation and protein degradation, severe consequences associated with deterioration in seeds, have been observed within three months of storage. These results showed that the embryos become increasingly susceptible to deterioration as the advancement of germination occurs. Therefore, it is believed that the heterogeneity in the degree of maturation is one of the major causes of seed deterioration in *A. angustifolia*. It is suggested that the changes in reserve metabolites are not due to deterioration, but are based on seed metabolism itself providing energy for germination, characterizing the metabolic continuum in this seeds, as opposed to the behavior of orthodox seeds. Biochemical damage to metabolism occurred prior to complete viability loss, and was not due to failure of enzymatic mechanisms of protection, which responded promptly. The information generated here may contribute to elucidate points misunderstood on postharvest metabolism of recalcitrant seeds.

Keywords: *Araucaria angustifolia*. Seed conservation. Recalcitrant seeds. Reserve metabolism. Antioxidant enzyme activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore adulta (A), pinhas (B e C) e pinhões maduros de <i>A. angustifolia</i> .	26
Figura 2 – Relação hipotética entre sobrevivência e teor de água em sementes. As sementes expressam danos quando secas abaixo de certos teores de água. O limite inferior de teor de água tolerado para sementes recalcitrantes é cerca de 0,2 g H ₂ O g MS ⁻¹ , mas os valores limiares podem ser bem acima deste valor, dependendo do tipo de tecido, maturidade e espécie. As sementes ortodoxas não exibem imediatamente um limite mínimo de água (curva tracejada), mas ao longo do tempo mostram uma ruptura nas relações de longevidade (curva sólida). As sementes classificadas como intermediárias podem apresentar teor de água limiar intermediário. Adaptado de Walters, 2015.	300
Figura 3 – Viabilidade típica das sementes em resposta ao tempo de armazenamento, com um período assintomático em que poucas alterações são detectáveis na sobrevivência das sementes seguido por um rápido declínio da viabilidade. Adaptado de Walters et al., 2010.	322
Figura 4 – Modelo proposto para explicar o comportamento de sementes recalcitrantes no armazenamento. A linha horizontal indica o teor de água inicial das sementes; a linha sólida superior indica o teor de água exigido nos estádios sucessivos da germinação; a linha sólida inferior indica o teor de água mínimo necessário para a sobrevivência das sementes. Adaptado de Farrant et al., 1986.	37
Figura 5 – Germinação de sementes de <i>A. angustifolia</i> em embalagens com restrição à perda de água (A) e sementes atacadas por microrganismos (B) aos seis meses de armazenamento em ambiente sem controle térmico.	38
Figura 6 – Eventos metabólicos que ocorrem durante a deterioração da semente. Adaptado de Osborne, 1980.	39
Figura 7 – Representação de alguns estressores ou iniciadores de espécies reativas do oxigênio (ROS) e as consequências biológicas que conduzem a uma variedade de disfunções fisiológicas que podem conduzir à morte celular. Adaptado de Scandalios, 2005.	41
Figura 2.1 – Appearance of <i>Araucaria angustifolia</i> seeds and embryos at early developmental stages I (A, B), II (C, D), III (E, F) and IV (G, H), observed during the storage period, showing cotyledons (c) and embryonic axes (ea). Bars indicate 1 cm.	6767

Figura 2.2 – Viability of *Araucaria angustifolia* embryos assessed by tetrazolium (A) and pH exudate tests (B) of freshly collected seeds, and seeds in storage in the natural environment and dry chamber. Values represent the mean of seed lots from 4 replications (n=25) for each treatment (from early developmental categories I and II), and vertical bars are the pooled standard errors of the mean (ANOVA). * indicates the presence of significant differences between the mean of at least one storage condition treatment ($P \leq 0.05$) in each storage period. ** indicates the presence of significant differences between the mean of the storage period treatment ($P \leq 0.05$) in relation to the previous period, for at least one storage condition.72

Figura 2.3 – Moisture content of seeds of *Araucaria angustifolia* freshly collected and in storage in the natural environment and cold chamber. Values represent the mean of seed lots from 4 replicates (n=3) for each treatment (from early developmental categories I, II, III and IV), and vertical bars are the pooled standard errors of the mean (ANOVA). * indicates the presence of significant differences between the mean of at least one storage condition treatment ($P \leq 0.05$) in each storage period. ** indicates the presence of significant differences between the mean of the storage period treatment ($P \leq 0.05$) in relation to the previous period, for at least one storage condition.72

Figura 2.4 – Electrical conductivity of *Araucaria angustifolia* embryos from freshly collected seeds, and from seeds in storage in the natural environment and dry chamber. Values represent the mean of seed lots from 4 replicates (n=10) for each treatment (from early developmental categories I, II, III and IV), and vertical bars are the pooled standard errors of the mean (ANOVA). * indicates the presence of significant differences between the mean of at least one storage condition treatment ($P \leq 0.05$) in each storage period. ** indicates the presence of significant differences between the mean of the storage period treatment ($P \leq 0.05$) in relation to the previous period, for at least one storage condition.744

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características para explicar diferentes graus de recalcitrância	29
Tabela 2.1 – Reference temperature and relative humidity data for the city of Lages, SC, during storage of <i>Araucaria angustifolia</i> seed lots, according to Epagri/Ciram (2014).....	66
Tabela 2.2– Embryo mass and relative percentage of total seed mass according to early developmental stage of <i>Araucaria angustifolia</i>	69
Tabela 2.3 – Percentage of <i>Araucaria angustifolia</i> seeds in early developmental categories I, II, III and IV, observed during storage in the natural laboratory environment and cold chamber.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido abscísico
APX – Ascorbato peroxidase
CAT – Catalase
DHAR – Deidroascorbato redutase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDC – “Early developmental category”
FOM – Floresta Ombrófila Mista
GSHPx – Glutathione peroxidase
GSSGR – Glutathione redutase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
ISTA – International Seed Testing Association
IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
LEA – Proteínas “Late embryogenesis abundant”
MDHAR – Monodeidroascorbato redutase
O₂ – Oxigênio molecular
O₂^{•-} – Radical superóxido
O₂¹ – Oxigênio singleto
•OH – Radical hidroxila
PEG – Polietilenoglicol
RNA – Ácido ribonucléico
ROS – Espécies reativas do oxigênio
SOD – Superóxido dismutase
TBARS – substâncias reativas ao TBA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 A ESPÉCIE <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	25
3.2 COMPORTAMENTO DAS SEMENTES QUANTO AO ARMAZENAMENTO	27
3.3 CONSERVAÇÃO DE SEMENTES RECALCITRANTES	31
3.4 SEMENTES RECALCITRANTES DE <i>Araucaria angustifolia</i> .	33
3.5 GERMINAÇÃO PRECOCE EM SEMENTES RECALCITRANTES	35
3.6 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DETERIORAÇÃO E METABOLISMO DE SEMENTES NO ARMAZENAMENTO.....	38
3.6.1 Danos ao sistema de membranas celulares	39
3.6.2 Danos oxidativos resultantes da presença de Espécies Reativas do Oxigênio.....	40
3.6.3 Alterações nos sistemas enzimáticos antioxidantes.....	42
3.6.4 Alterações no metabolismo de componentes de reserva	43
4. REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO 1	
pH EXUDATE TEST FOR DETERMINING THE VIABILITY OF <i>Araucaria angustifolia</i> SEEDS.....	55
1.1 ABSTRACT	57
1.2 REFERENCES	57
CAPÍTULO 2	
ESTABLISHMENT OF POST-HARVEST EARLY- DEVELOPMENTAL CATEGORIES FOR VIABILITY MAINTENANCE OF <i>Araucaria angustifolia</i> SEEDS.....	61
2.1 ABSTRACT	63
2.2 INTRODUCTION	63
2.3 MATERIAL AND METHODS	65

2.3.1 Plant material.....	65
2.3.2 Seed storage and determination of physiological quality ...	65
2.3.3 Categorization of early developmental stages	66
2.3.4 Seed quality analysis during storage	68
2.3.5 Experimental design and statistical analysis	68
2.4 RESULTS.....	69
2.4.1 Early development of seeds during storage.....	69
2.4.2 Seed quality after storage.....	71
2.5 DISCUSSION	74
2.6 REFERENCES	77

CAPÍTULO 3

STORAGE POTENTIAL OF LOCAL VARIETIES OF BRAZILIAN PINE SEEDS..... 83

3.1 ABSTRACT	85
3.2 REFERENCES	85

CAPÍTULO 4

RESERVE METABOLISM OF STORED AND GERMINATED *Araucaria angustifolia* SEEDS 89

4.1 ABSTRACT	91
4.2 REFERENCES	91

CAPÍTULO 5

STORAGE ELICITS A FAST ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY IN *Araucaria angustifolia* EMBRYOS..... 97

5.1 ABSTRACT	99
5.2 REFERENCES	99

CONSIDERAÇÕES FINAIS105

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O bioma Mata Atlântica contém alta biodiversidade e endemismo de espécies, sendo considerado um dos quatro mais importantes *hotspots* para a conservação da natureza no planeta (MYERS et al., 2000). Este bioma é constituído por diversos ecossistemas, dentre os quais a Floresta Ombrófila Mista (FOM) ou Floresta de Araucária, é uma das fitofisionomias mais ameaçadas.

A principal espécie da FOM é a *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Otto Kuntze, conífera nativa de grande importância econômica e ecológica na sua região de ocorrência natural. Suas sementes são utilizadas como alimento de elevado valor nutricional, e a espécie possui grande potencial madeireiro, motivo pelo qual as populações naturais da araucária, como é popularmente conhecida, sofreram uma exploração intensiva ao longo do século passado (GUERRA et al., 2008). Por isso, atualmente a espécie consta nas principais listas nacionais e internacionais de componentes da flora ameaçados de extinção. Adicionalmente, a comunidade científica vem constatando a ocorrência da erosão genética da espécie aliada a uma seleção negativa nas populações naturais (STEINER, 2009).

As sementes de araucária são recalcitrantes, sensíveis à dessecação, perdem totalmente sua viabilidade ao atingirem 25% de umidade (TOMPSETT, 1984; FARRANT et al., 1989; PANZA et al., 2002, GARCIA et al., 2014), e em, no máximo, 180 dias após a dispersão se mantidas sob condições naturais de ambiente (FOWLER et al., 1998; LORENZI, 2002; GARCIA et al., 2014). Estudando a recalcitrância em sementes, muitos pesquisadores admitem que a forma eficiente de conservação destas espécies é através da conservação *in situ*, da criopreservação ou utilizando-se de técnicas como a embriogênese somática. Mas, por falta de métodos padronizados e considerando a urgência em se conservar ou ainda ampliar a base genética da araucária, ações de conservação a curto prazo, como a ampliação do período de armazenamento, podem ser positivas para a implementação de programas de recuperação de áreas de vegetação nativa, de aproveitamento racional e econômico, e para favorecer a produção de mudas durante a maior parte do ano. Estes programas devem ser aliados à conscientização das comunidades tradicionais e populações rurais, que reconheçam na araucária o seu grande potencial de uso para a conservação adequada dos recursos genéticos.

Entretanto, já que as sementes são a principal forma de propagação da araucária, a rápida perda de viabilidade constitui uma

difficuldade às ações imediatas de restauração de áreas, que exigem sementes em quantidade e qualidade. Mas a longevidade das sementes também é influenciada pelas interações entre genótipo e ambiente durante a maturação e a colheita e, após esta, pelas condições de armazenamento. A condição de alta umidade das sementes recalcitrantes durante o armazenamento protege contra a desorganização das membranas, permite a atuação de mecanismos de reparo, a atividade de enzimas importantes, a menor ocorrência de danos por embebição e, conseqüentemente, o prolongamento da conservação. Mas a manutenção do teor de água das sementes acima dos níveis críticos para a espécie pode levar ao início do processo germinativo, mesmo em condições de baixa temperatura de armazenamento. Neste caso, o metabolismo acelerado se mantém, exigindo o fornecimento de água adicional para que o processo de germinação possa ser concluído, mas se a água não for fornecida, ocorrem danos subcelulares que podem conduzir à perda de viabilidade (FARRANT et al., 1989; PAMMENTER et al., 1994; BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; BARBEDO; CÍCERO, 2000).

Por outro lado, o armazenamento sem limitação de umidade pode propiciar o aumento da atividade respiratória e o ataque de microrganismos, promovendo o processo de deterioração. Considerando-se que os métodos tradicionais de secagem e armazenamento não são adequados para as sementes recalcitrantes, novas abordagens devem ser investigadas.

Em sementes de araucária, alguns pesquisadores admitem a ocorrência de germinação precoce durante o armazenamento (FARRANT et al., 1989; GARCIA et al., 2014), acelerando os processos envolvidos com a perda de viabilidade celular. Esta ocorre em resposta à deterioração, conduzindo à morte das sementes recalcitrantes através de uma via de morte celular programada induzida pelo estresse oxidativo, modulado pelas espécies reativas do oxigênio – ROS, o qual resulta em mudanças fisiológicas que geram danos, senescência e morte celular. Os mecanismos enzimáticos de proteção buscam neutralizar a ação das ROS quando há o avanço no processo deteriorativo durante o armazenamento das sementes. Mas, até o momento, apenas um trabalho foi realizado buscando informações sobre a presença de tais mecanismos de proteção em sementes de araucária, sendo detectada apenas a ação do sistema composto pela superóxido dismutase (GARCIA et al., 2015) e necessitando, portanto, de maior aprofundamento no assunto.

Em trabalho anterior, foi possível observar que, durante o armazenamento das sementes de araucária em ambiente sem controle de temperatura, houve 80% de germinação aos 4 meses de armazenamento

(GARCIA et al., 2014). Ou seja, o armazenamento sem controle térmico não foi eficiente para retardar o metabolismo e conservar as sementes para utilização futura, havendo germinação das sementes mesmo sob condições desfavoráveis de substrato, umidade, luminosidade, entre outros. Mas, o armazenamento em refrigerador (5 °C) proporcionou a conservação das sementes por tempo superior (64% de viabilidade aos 6 meses após a coleta). Outros resultados demonstraram que há alterações no perfil de metabólitos (proteínas, lipídios, carboidratos, amido, fenólicos) nas sementes ao longo do armazenamento (ARALDI et al., 2016). Por isso, há a necessidade de melhor caracterização das alterações que se mostraram mais relevantes, para que o processo de deterioração possa ser mais claramente conhecido, possibilitando a manipulação dos fatores importantes com vistas a prolongar a qualidade dessas sementes após a colheita.

Apesar da importância da espécie, ainda são poucas as informações sobre os fatores que determinam a perda de viabilidade em sementes de araucária. Alguns estudos investigaram a redução na qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento (FOWLER et al., 1998; PIRIZ CARRILLO et al., 2003; CAÇOLA et al., 2006; AMARANTE et al., 2007; GARCIA et al., 2014), mas pouco foi descrito até o momento sobre as alterações metabólicas após a maturidade e dispersão das sementes.

Neste cenário, esta pesquisa objetivou identificar mecanismos fisiológicos e bioquímicos de sementes de *A. angustifolia* que conduzem à intolerância ao armazenamento e início precoce do metabolismo germinativo após a colheita. Pretende-se gerar informações relevantes para a ampliação do período de conservação das sementes, permitindo o prolongamento da qualidade, aumentando a disponibilidade de sementes e, em consequência, servindo como subsídios essenciais ao uso e à conservação da espécie. Acredita-se ainda que tal estudo poderá gerar diretrizes importantes para pesquisas futuras que visem à conservação de sementes de espécies recalcitrantes. Para tanto, os principais mecanismos fisiológicos e bioquímicos estudados estão apresentados nesta tese na forma de capítulos, para favorecer o entendimento e a sequência das atividades desenvolvidas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar eventos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na perda de viabilidade e início precoce do metabolismo germinativo em sementes de *Araucaria angustifolia* após a colheita e durante o armazenamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar o potencial de uso do teste de pH do exsudato em sementes de *A. angustifolia*, visando obter um método rápido e eficiente para a avaliação da viabilidade;

b) Avaliar as alterações na qualidade fisiológica das sementes de *A. angustifolia* durante o armazenamento e identificar o início do processo de germinação das sementes em resposta à intensificação do metabolismo em recém-colheita e no armazenamento, categorizando-as em relação ao estágio de desenvolvimento/germinação;

c) Avaliar o comportamento de sementes de diferentes variedades de *A. angustifolia* quanto à manutenção da qualidade fisiológica durante o armazenamento, visando prolongar o período de disponibilidade de sementes para fins de utilização e conservação;

d) Identificar as eventuais alterações nos metabólitos de reserva nas sementes de *A. angustifolia* durante o armazenamento controlado a fim de compreender os processos de hidrólise e mobilização baseados no metabolismo germinativo imposto após a colheita;

e) Avaliar alterações associadas ao estresse oxidativo e à integridade dos sistemas antioxidantes enzimáticos compostos pela superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase em embriões zigóticos de *A. angustifolia* em estádios iniciais de armazenamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A ESPÉCIE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

A família Araucariaceae está distribuída principalmente no hemisfério sul, ocorrendo na Nova Caledônia, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (SETOGUCHI et al., 1998). O gênero *Araucaria* foi um dos principais componentes das florestas na era Mesozoica e fósseis de *Araucaria angustifolia* datam do final do período Cretáceo e início do período Terciário (SETOGUCHI et al., 1998).

A *A. angustifolia* (pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-Paraná ou simplesmente araucária) é a única espécie do gênero nativa do Brasil e a gimnosperma de maior importância econômica da Floresta Ombrófila Mista Brasileira (ELBL et al., 2015), também conhecida como “Floresta de Araucária”, integrando o bioma da Mata Atlântica. A espécie originalmente distribuía-se pelos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, chegando até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, além do leste da Província de Misiones, na Argentina e leste do Paraguai (CARVALHO, 1994). Esta árvore é dióica, raras vezes monóica, apresentando estrutura reprodutiva masculina em forma cilíndrica com 10-15 cm de comprimento, chamada de androstóbilo, amentilho, mingote, charuto ou sabugo, geralmente localizada em ramos jovens, e estrutura reprodutiva feminina em formato subarredondado, localizada no ápice dos ramos, com 10-20 cm de diâmetro quando madura, chamada de ginostrobilo, estróbilo ou pinha, a qual pode conter entre 10 e 150 sementes ou pinhões (Figura 1) (MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2004; REITZ; KLEIN, 1966). O pinhão é o grande diásporo da *A. angustifolia*, no qual está presente o embrião que contém dois cotilédones, e o tecido de reserva formado pelo endosperma primário ou gametófito (FERREIRA, 1981). Para a espécie, o diásporo tem sido considerado a semente com invólucros ou simplesmente “semente” (FERREIRA; HANDRO, 1979).



Figura 1 – Árvore adulta (A), pinhas (B e C) e pinhões maduros de *A. angustifolia*.

A espécie apresenta diversos usos, destacando-se a utilização de sua madeira para construções, serrarias e produção de celulose e papel, além do uso ornamental da árvore, e o consumo das suas sementes, muito apreciadas pela fauna e na culinária regional (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2003; MATTOS, 2011). Os galhos, refugos e o nó de pinho servem para lenha e combustível de caldeiras (GUERRA et al., 2003). Sua resina é utilizada na fabricação de vernizes, terebentina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos (CARVALHO, 1994). A madeira serrada e laminada da *A. angustifolia* foi, por um longo período, um dos produtos mais importantes na exportação brasileira, e ocorreu uma exploração progressiva das populações da espécie em função de seu elevado valor econômico (EIRA et al., 1994). Esta intensa exploração ao longo do século passado associada à ausência de programas de melhoramento e conservação levaram à redução de mais de 97% de sua cobertura original em menos de três gerações da árvore. Estima-se que restam apenas alguns remanescentes que totalizam entre 2% a 4% da área original (GUERRA et al., 2003), sendo que no Estado de Santa Catarina estimam-se entre 21,9% a 26,9% de áreas remanescentes (VIBRANS et al., 2014). Por isso, a *A. angustifolia* foi incluída na lista de espécies ameaçadas da União Internacional para a

Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) na categoria de criticamente ameaçada (THOMAS, 2013). A espécie consta também na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008).

Atualmente, a paisagem da Floresta de Araucária está altamente fragmentada, o que dificulta o fluxo gênico entre as populações remanescentes e aumenta a probabilidade de ocorrência da erosão genética e da perda da capacidade adaptativa frente às mudanças do ambiente (STEINER, 2009). As restritas ações de recuperação que vêm ocorrendo em regiões da Floresta de Araucária são realizadas por produtores, instituições oficiais e organizações não governamentais ambientalistas que, por falta de informações técnico-científicas e uma vez que haja ausência de sementes nas populações locais, utilizam sementes coletadas em outras regiões, sem critérios de seleção e cuidado em escolher as procedências que melhor se adaptem a determinado local (GUERRA et al., 2003; HIRANO, 2004). Além disso, a regeneração natural da *A. angustifolia* é dificultada pela predação de suas sementes (LORENZI, 2002), que ocorre antes (0,7% de sementes predadas, segundo MANTOVANI; MORELLATO; REIS, 2004) e após a sua dispersão natural (20,8%, segundo SOLÓRZANO FILHO, 2001).

3.2 COMPORTAMENTO DAS SEMENTES QUANTO AO ARMAZENAMENTO

Ao final da fase de maturação, algumas sementes sofrem rápida redução no teor de água, não germinando devido à indisponibilidade de água (quiescência); em outras, o teor de água permanece elevado e, uma vez que as sementes nesta fase já estão completamente formadas, inicia-se o processo germinativo (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Apesar de muitos estudos sobre o comportamento das sementes durante o armazenamento ainda serem necessários para que haja a correta conservação da biodiversidade (CARVALHO; SILVA; DAVIDE, 2006), em geral, elas são classificadas em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. O grau de tolerância à dessecação é considerado a diferença mais evidente entre as sementes ortodoxas e recalcitrantes (MARCOS FILHO, 2005; WALTERS, 2015).

Diversos fatores podem estar envolvidos na tolerância ou na sensibilidade à dessecação, mas têm sido incluídos: o controle de reguladores de crescimento, principalmente o ABA (BRUGGINK; VAN DER TOORN, 1995), o acúmulo de moléculas de substâncias protetoras ao final da maturação, como as proteínas LEA e o balanço entre

açúcares solúveis (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001), características estruturais incluindo diferenciação do eixo embrionário, vacuolização, diferenciação das organelas e organização de membranas (GOODMAN; JACOBS; KARRFALT, 2005; BONJOVANI; BARBEDO, 2008; PÉREZ; HILL; WALTERS, 2012), a reação do citoesqueleto e estabilidade do DNA (FARIA et al., 2005), e a presença, operação e eficiência dos sistemas antioxidantes (SERSHEN et al., 2012). Mas nenhum deles, isoladamente, pode elucidar a tolerância ou sensibilidade à dessecação (VERTUCCI; FARRANT, 1995; BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; PAMMENTER; BERJAK, 1999). Cabe ressaltar que os mecanismos de aquisição da tolerância à dessecação são controlados por um grande número de genes (ANGELOVICI et al., 2010).

As sementes ortodoxas são aquelas que adquirem tolerância à dessecação durante o seu desenvolvimento, podem ser secas a baixos teores de água (abaixo de 10% de umidade) e retêm a viabilidade no estado seco por período prolongado (PAMMENTER; BERJAK, 2000), além de tolerarem o armazenamento a baixas temperaturas sem que ocorram danos ao seu metabolismo (DAVIDE; SILVA, 2008; WALTERS, 2015). Assim, podem ser mantidas em condições *ex situ* a longo prazo se forem mantidas em ambiente adequado (HONG; ELLIS, 1996). As sementes ortodoxas, provavelmente, não só toleram a dessecação, mas dependem dela para redirecionar os processos metabólicos do desenvolvimento em direção à germinação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

Já as sementes recalcitrantes como *A. angustifolia*, *Hevea brasiliensis* e *Inga vera*, não apresentam uma fase de dessecação definida após a maturação, são dispersas ou colhidas com relativamente alto teor de água e são altamente suscetíveis a danos de dessecação (ROBERTS, 1973; SONG et al., 2003). Por isso, não podem ser mantidas em condições semelhantes às utilizadas para as sementes ortodoxas após a colheita, inviabilizando o seu armazenamento por longo prazo (MARCOS FILHO, 2005; SONG et al., 2003). Além disso, muitas recalcitrantes são sensíveis a baixas temperaturas, especialmente aquelas de origem tropical (DAVIDE; SILVA, 2008; PAMMENTER; BERJAK, 1999; SONG et al., 2003).

Uma característica das sementes recalcitrantes é a grande variabilidade de comportamento entre espécies e dentro de uma mesma espécie. Isto significa que dentro do grupo das recalcitrantes, há um contínuo de comportamentos que variam de sementes minimamente recalcitrantes, com longo tempo de vida e bastantes tolerantes à

dessecação, e maximamente recalcitrantes, com tempo de vida e tolerância à dessecação reduzidos, conforme descrito na Tabela 1 (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1988; MARCOS FILHO, 2005; PAMMENTER; BERJAK, 2000).

Tabela 1 – Características das sementes quanto aos diferentes graus de recalcitrância

Tipos de sementes recalcitrantes		
Mínima	Moderada	Alta
Maior tolerância à perda de água	Tolerância moderada à perda de água	Pouco tolerante à perda de água
Germinação lenta, em ausência de quantidade adicional de água	Velocidade média de germinação em ausência de água adicional	Germinação rápida em ausência de água adicional
Maior tolerância a baixas temperaturas	Maioria das espécies é sensível a baixas temperaturas	Sensível a baixas temperaturas
Distribuição subtropical/temperada	Distribuição tropical	Florestas tropicais e terras úmidas
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> ← Longevidade no armazenamento → </div>		

Adaptado de Pammenter e Berjak, 2000.

As plantas que produzem sementes recalcitrantes geralmente ocorrem em habitats que permitem rápido estabelecimento de plântulas sob condições naturais, uma característica que pode ser considerada vantajosa à espécie e que também evita a predação (BERJAK; FARRANT; PAMMENTER, 1989; MARCOS FILHO, 2005). Mas a manutenção da viabilidade de sementes de espécies com comportamento recalcitrante é problemática, por isso as opções para a conservação de germoplasma de espécies produtoras de sementes não-ortodoxas são muito limitadas (CUNHA et al., 1992; DREW; PAMMENTER; BERJAK, 2000; HONG; ELLIS, 1996), já que para a composição dos Bancos de Germoplasma, normalmente é necessário reduzir o grau de umidade a níveis entre 3 e 7% (EIRA et al., 1994; MARCOS FILHO, 2005). Entretanto, alguns autores alertam para a pouca atenção que a pesquisa de métodos que preservem a qualidade pós-colheita de materiais semíniferos tem recebido (CAÇOLA et al., 2006).

As diferenças observadas no comportamento das sementes são resultado do processo de seleção natural, em concordância com as condições ambientais em que a espécie se desenvolveu (BARBEDO;

MARCOS FILHO, 1998). Mas nem todas as espécies se enquadram nos padrões descritos, verificando-se a existência de comportamentos intermediários ao ortodoxo e ao recalcitrante em relação ao armazenamento (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Portanto, este contínuo entre o comportamento das sementes de variadas espécies não se aplica apenas para o grupo das recalcitrantes. O comportamento de sementes em geral é visto como constituindo um processo contínuo, compreendido entre as sementes mais tolerantes à dessecação, as ortodoxas, e na outra extremidade aquelas mais sensíveis à dessecação, as espécies recalcitrantes (DREW; PAMMENTER; BERJAK, 2000; PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Walters (2015) propõe um modelo para representar a relação entre a sobrevivência e o teor de água em sementes de diferentes comportamentos quanto ao armazenamento, como ilustrado na Figura 2. O teor de água limiar tolerado por uma semente é uma medida indireta do estresse hídrico e sua variação entre as categorias de sementes implica a variação na quantidade de estresse tolerada e ilustra a natureza quantitativa da tolerância à dessecação (WALTERS, 2015).

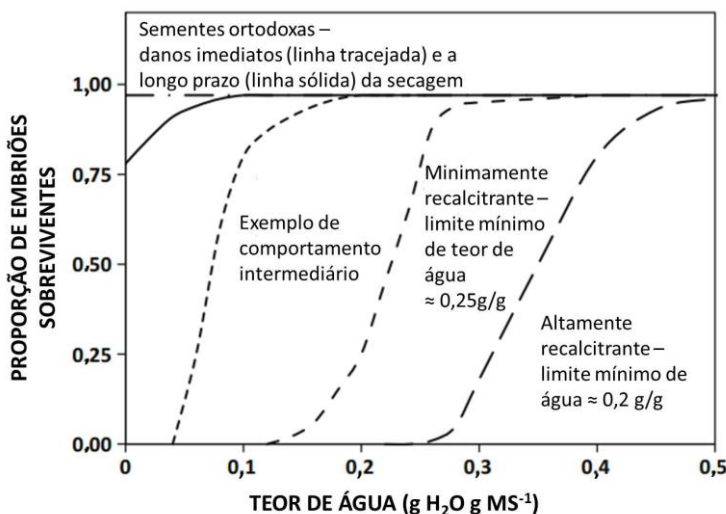


Figura 2 – Relação hipotética entre sobrevivência e teor de água em sementes. As sementes expressam danos quando secas abaixo de certos teores de água. O limite inferior de teor de água tolerado para sementes recalcitrantes é cerca de 0,2 g H₂O g MS⁻¹, mas os valores limiares podem ser bem acima deste valor, dependendo do tipo de tecido, maturidade e espécie. As sementes ortodoxas não exibem imediatamente um limite mínimo de água (curva tracejada), mas ao

longo do tempo mostram uma ruptura nas relações de longevidade (curva sólida). As sementes classificadas como intermediárias podem apresentar teor de água limiar intermediário. Adaptado de Walters, 2015.

3.3 CONSERVAÇÃO DE SEMENTES RECALCITRANTES

A maturidade fisiológica está associada à máxima qualidade da semente e é atingida quando há a completa alocação de substâncias aos tecidos de reserva, ao final da fase de maturação durante o desenvolvimento da semente. Ao atingirem a maturidade, as sementes recalcitrantes já estão completamente formadas e prontas para a dispersão, pois são independentes da secagem para adquirir a capacidade germinativa (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). O potencial de desempenho apresentado pela semente começa a ser revertido ao metabolismo degenerativo, cuja consequência final é a perda da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005).

A viabilidade de uma semente está relacionada à sua capacidade em reter o potencial germinativo, e a sua longevidade traduz o tempo durante o qual ela é capaz de conservar a viabilidade (CARDOSO, 2004). A longevidade é, em geral, determinada pela umidade, temperatura de armazenamento e outras características da própria semente, as quais são influenciadas por interações genéticas e ambientais durante a maturação e a colheita (WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010).

A deterioração, degeneração ou envelhecimento de sementes, iniciada imediatamente após a maturidade, determina o desequilíbrio funcional dos tecidos ativos, provocando a inativação progressiva do metabolismo (MARCOS FILHO, 2005). A deterioração caracteriza-se por uma relação sigmoide entre viabilidade e tempo, em que uma fase sem alterações aparentes no vigor das sementes é seguida por uma fase de morte rápida (WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010), conforme está representado na Figura 3.

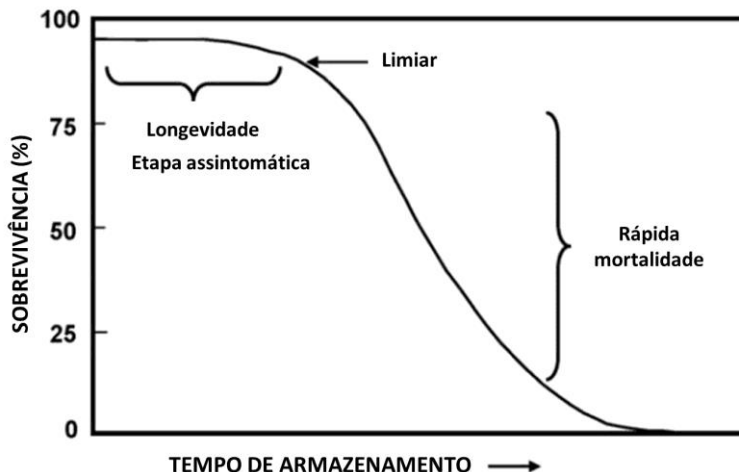


Figura 3 – Viabilidade típica das sementes em resposta ao tempo de armazenamento, com um período assintomático em que poucas alterações são detectáveis na sobrevivência das sementes seguido por um rápido declínio da viabilidade. Adaptado de Walters et al., 2010.

A longevidade da semente, tem uma duração indeterminada e a morte ocorrerá sem aviso quando um certo limiar for alcançado (WALTERS; BALLESTEROS; VERTUCCI, 2010).

Quando o processo de deterioração tem início, diversas alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas começam a ser progressivamente observadas (VILLELA; PERES, 2004), ocorrendo perda gradual da qualidade e culminando com a morte da semente (COOLBEAR, 1995; MARCOS FILHO, 2005).

A taxa de deterioração das sementes é altamente influenciada pelas condições do meio ambiente, dependendo diretamente da temperatura, da umidade relativa do ar e do histórico da população, fatores que podem afetar suas características físicas, químicas, fisiológicas e sanitárias (ROBERTS, 1981). Portanto, as condições de armazenamento influenciam a longevidade da semente, sobretudo pelo teor de água e pela temperatura, a qual atua sobre as atividades respiratórias das sementes e dos microrganismos presentes (VILLELA; PERES, 2004).

Para a maioria das espécies, o grau baixo de umidade constitui a condição essencial para o bom armazenamento; por isso, quanto mais secas forem as sementes e as condições ambientais, em geral, maiores

serão as possibilidades de se prolongar sua longevidade (BACCHI, 1958; DREW; PAMMENTER; BERJAK, 2000). Para sementes recalcitrantes como a *A. angustifolia*, entretanto, o armazenamento em condições de dessecação provoca a ocorrência de danos subcelulares, os quais podem ser reparados quando as sementes são colocadas em condições adequadas para a germinação (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989; TARQUIS; BRADFORD, 1992). No entanto, quando uma proporção crítica de células é danificada, ocorre perda total da viabilidade (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989).

Já o armazenamento com teores de água relativamente altos tem gerado resultados favoráveis apesar das dificuldades encontradas na manutenção desta condição por período prolongado (AMARANTE et al., 2007; CAÇOLA et al., 2006; FOWLER; BIANCHETTI; ZANON, 1998; GARCIA et al., 2014). O armazenamento de sementes com umidade elevada permite a atuação de mecanismos de reparo do metabolismo, mas pode acelerar o processo de deterioração, pois permite a manutenção de alta atividade metabólica com o consumo de importantes reservas, além de favorecer a proliferação de patógenos (WALTERS, 2015). Este tipo de armazenamento é estritamente uma opção de curto prazo, porque irá promover o metabolismo germinativo e respiratório, podendo favorecer a contaminação microbiana, e causar danos se a água não for fornecida em quantidades adequadas para dar continuidade à germinação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; BERJAK; FARRANT; PAMMENTER, 1989; BERJAK; PAMMENTER, 2013; DREW; PAMMENTER; BERJAK, 2000; PAMMENTER et al., 1994). Portanto, a alta umidade também promove o processo de deterioração (BARBEDO; CICERO, 2000).

Mesmo quando armazenadas com restrições hídricas, a velocidade e a intensidade de deterioração são maiores em sementes recalcitrantes, pois as alterações metabólicas associadas à germinação continuam durante o armazenamento. Por isso, a busca por métodos eficientes que controlem ou prolonguem a longevidade das sementes recalcitrantes são assuntos de grande interesse na comunidade científica internacional. Apesar dos esforços, pesquisas referentes à conservação de sementes recalcitrantes ainda não produziram informação suficiente para o desenvolvimento de métodos que permitam ampliar sua capacidade de armazenamento, e que se aplique para todas as espécies (ANDRÉO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006).

3.4 SEMENTES RECALCITRANTES DE *Araucaria angustifolia*

As sementes de *A. angustifolia* são classificadas como recalcitrantes pois perdem rapidamente o seu potencial fisiológico após a colheita, sendo que abaixo de 38% de umidade há progressiva perda de viabilidade e o grau de umidade letal é de 25% (EIRA et al., 1994; ESPINDOLA et al., 1994; FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989; RAMOS; SOUZA, 1991; TOMPSETT, 1984). Dentro desta categoria, a espécie se enquadra naquelas minimamente recalcitrantes (DREW; PAMMENTER; BERJAK, 2000).

A característica recalcitrante das sementes de *A. angustifolia* dificulta as ações de conservação. Alguns autores chegam a indicar que, sempre que possível, a semeadura deve ser realizada imediatamente após a colheita (BIANCHETTI; RAMOS, 1981). Outros recomendam que, para fins de conservação das sementes mesmo a curto prazo, deve-se armazená-las logo após a colheita, com o máximo grau de umidade possível e evitando-se a perda de água durante esse período (EIRA et al., 1994). O uso de embalagens plásticas reduz a perda de água, e pode favorecer a conservação de sementes (POPINIGIS, 1985). Entretanto, o armazenamento de sementes com alto grau de umidade pode propiciar o surgimento de problemas como a proliferação de fungos e a germinação de sementes no interior da embalagem, causando rápida deterioração (EIRA et al., 1994).

Diversos pesquisadores investigaram métodos para a conservação de sementes de *A. angustifolia* durante o armazenamento. Alguns autores conseguiram conservar as sementes por 12 meses acondicionando-as com a umidade que apresentaram na coleta (43%), em câmara fria e embalagem de polietileno selada (FOWLER; BIANCHETTI; ZANON, 1998). Outros observaram a manutenção da viabilidade das sementes armazenadas em condições de refrigeração durante o período de até 180 dias, mas assumem que pode ter havido redução gradativa do vigor a partir dos 60 dias de armazenamento (CAÇOLA et al., 2006). Em pesquisa semelhante, observou-se acima de 30% de viabilidade aos 190 dias de armazenamento em temperatura ambiente variando entre 15 e 25°C (FERREIRA; HANDRO, 1979), ou 60% de viabilidade aos 180 dias de armazenamento em refrigerador a 5°C, mantendo-se elevado vigor das sementes (GARCIA et al., 2014). A mesma temperatura de armazenamento (5°C) associada à umidade relativa do ar de 80% e o uso de embalagens plásticas foi considerada eficiente na conservação da qualidade fisiológica das sementes de *A. angustifolia* (SUITER FILHO, 1966). O armazenamento de pinhões em temperaturas iguais ou superiores a 20°C leva à rápida perda de viabilidade fisiológica, em função do gasto energético com a respiração

e da desorganização celular relacionada à desidratação e à senescência dos tecidos (AMARANTE et al., 2007). Enfim, as inúmeras pesquisas constataram que o período máximo em que as sementes de *A. angustifolia* podem manter sua viabilidade e vigor ainda é muito curto para suprir as demandas da conservação da espécie. Além disso, a germinação completa das sementes de *A. angustifolia* leva em torno de 60 a 70 dias (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2003; CAÇOLA et al., 2006; GARCIA et al., 2012; SHIBATA et al., 2013; GARCIA et al., 2014), o que dificulta o monitoramento da qualidade fisiológica.

É importante considerar também que os tecidos de embriões maduros de sementes de *A. angustifolia* armazenam principalmente lipídios e amido, e as características de suas células indicam uma estratégia de desenvolvimento contínuo sem a interposição de um estado seco (FARIAS-SOARES et al., 2013). Recentemente foi comprovada a presença de proteínas LEA do grupo II – desidrinas em embriões de *A. angustifolia* (FARIAS-SOARES et al., 2013), ligadas à estabilização de proteínas em ambientes de estresse hídrico (DURE, 1993). Já que as reservas de proteína do embrião são consumidas durante a germinação, os autores levantam a hipótese de que a principal função das desidrinas armazenadas nos corpos proteicos é ajudar as plântulas a suportar a desidratação que ocorre ao longo de germinação (FARIAS-SOARES et al., 2013) podendo, portanto, apresentar um papel fundamental, porém ainda incompreendido, no metabolismo das sementes da espécie.

3.5 GERMINAÇÃO PRECOCE EM SEMENTES RECALCITRANTES

A secagem ao final da maturação está associada à quiescência em sementes ortodoxas. Com a reidratação, há reativação do sistema metabólico pré-existente, suplementado pela síntese de novos componentes estruturais que resultam na emergência da raiz primária (ANGELOVICI et al., 2010; MARCOS FILHO, 2005). Nas sementes sensíveis à dessecação, não há secagem ao final do desenvolvimento, nem divisão definida entre desenvolvimento e germinação. Em função da ausência da fase de dessecação (ou fase muito curta), as sementes recalcitrantes geralmente apresentam atividade metabólica intensa durante sua formação, dispersão e após a colheita (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; CASTRO; BRADFORD; HILHORST, 2004; PAMMENTER; BERJAK, 2000). O metabolismo do desenvolvimento passa diretamente ao metabolismo de germinação, que continua durante o armazenamento (MARCOS FILHO, 2005). Portanto, pode ocorrer a

protrusão da raiz primária durante o armazenamento, em condições que não favorecem a continuidade do processo, devido à insuficiência de água para a manutenção do crescimento do eixo embrionário (ANDRÉO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006).

É importante ressaltar que nem todas as espécies apresentam germinação visível, com protrusão da raiz primária, mas os eventos subcelulares de germinação, como mudanças ultraestruturais, metabolismo e organização subcelular (especialmente mitocôndrias, retículo endoplasmático e plastídios) iniciam logo após a dispersão (ou até mesmo antes) em sementes recalcitrantes (BERJAK; PAMMENTER, 2013; DREW; PAMMENTER; BERJAK, 2000; OBROUCHEVA et al., 2012; WALTERS, 2015).

Por isso, tem sido sugerido que, durante o armazenamento, a intensificação do metabolismo das sementes recalcitrantes não somente dá início ao processo de germinação, mas torna as sementes gradualmente mais sensíveis à ausência de água (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; BERJAK; PAMMENTER, 2008; PAMMENTER; BERJAK, 2000). Isso porque a água é fundamental especialmente à primeira fase da germinação e, uma vez que há indisponibilidade de água para a semente durante o armazenamento, este pode gerar um estado de estresse hídrico às sementes (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998; PAMMENTER et al., 1994). Neste caso, elas estariam sujeitas a injúrias, as quais conduziriam à manifestação de mecanismos de proteção e reparo do metabolismo. Além disso, as intensas atividades respiratória e de consumo podem determinar uma redução acentuada da disponibilidade de reservas, associada ao metabolismo desordenado, com liberação e atividade de radicais livres, os quais provocam diversos prejuízos à conservação da viabilidade durante o armazenamento, favorecendo a rápida deterioração (ANDRÉO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006; BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

Estudando o comportamento de sementes recalcitrantes durante o armazenamento, FARRANT, PAMMENTER e BERJAK (1986), posteriormente referenciados por MARCOS FILHO (2005), desenvolveram o modelo apresentado na Figura 4, segundo o qual sementes submetidas à secagem lenta atingem estágio mais avançado da germinação antes da perda completa de viabilidade, o que ocorre sob graus de umidade relativamente elevados. Já as sementes submetidas à secagem rápida não apresentam progresso tão acentuado da germinação, mas sobrevivem com teores de água inferiores, ainda que os valores absolutos sejam variáveis de acordo com a espécie.

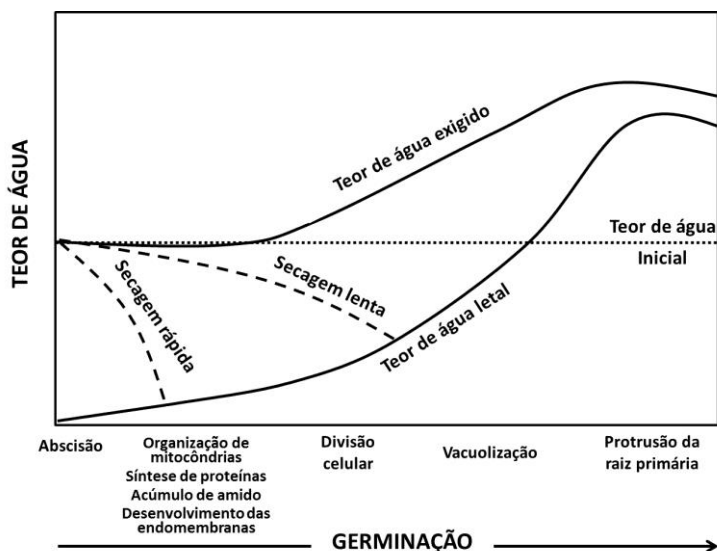


Figura 4 – Modelo proposto para explicar o comportamento de sementes recalcitrantes no armazenamento. A linha horizontal indica o teor de água inicial das sementes; a linha sólida superior indica o teor de água exigido nos estádios sucessivos da germinação; a linha sólida inferior indica o teor de água mínimo necessário para a sobrevivência das sementes. Adaptado de Farrant et al., 1986.

Alguns autores assumem a ocorrência de germinação precoce em sementes de *A. angustifolia*, tendo observado eventos subcelulares típicos de germinação, incluindo um aumento nos níveis de síntese proteica e de células meristemáticas, os quais iniciam logo após a dispersão das sementes e continuam durante o armazenamento (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989). Foi também observado que os embriões de sementes recém-colhidas de *A. angustifolia* realmente são metabolicamente ativos, mas a maioria dos núcleos da zona meristemática radicular parecem ser quiescentes (ESPINDOLA et al., 1994).

Em trabalhos prévios, foi possível constatar a ocorrência de germinação durante o armazenamento de sementes de *A. angustifolia*, pois 80% e 30% das sementes haviam germinado (ao mínimo emitido a raiz primária) aos 6 meses após a coleta, quando mantidas em condições de ambiente de laboratório em ausência de controle térmico e em refrigerador, respectivamente, demonstrando a ineficiência do

armazenamento convencional na manutenção da viabilidade das sementes, como apresentado na Figura 5 (GARCIA et al., 2014). Aos seis meses de armazenamento sob condição de ambiente sem controle térmico, 100% das sementes que não apresentaram a germinação precoce, encontravam-se atacadas por microrganismos e haviam perdido a viabilidade.



Figura 5 – Germinação de sementes de *A. angustifolia* em embalagens com restrição à perda de água (A) e sementes atacadas por microrganismos (B) aos seis meses de armazenamento em ambiente sem controle térmico.

3.6 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DETERIORAÇÃO E METABOLISMO DE SEMENTES NO ARMAZENAMENTO

A deterioração é um processo decorrente de diversas alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas que ocorrem simultaneamente e determinam a redução na qualidade fisiológica das sementes e culminam em sua morte (COOLBEAR, 1995; MARCOS FILHO, 2005). Diversos fatores podem promover a deterioração, e as características da espécie como longevidade natural e composição química, aliadas à qualidade inicial, grau de umidade da semente e condições do ambiente, tanto podem facilitar como retardar os eventos da deterioração (MARCOS FILHO, 2005). A Figura 6 ilustra os principais caminhos metabólicos que ocorrem à medida que progride a deterioração das sementes.

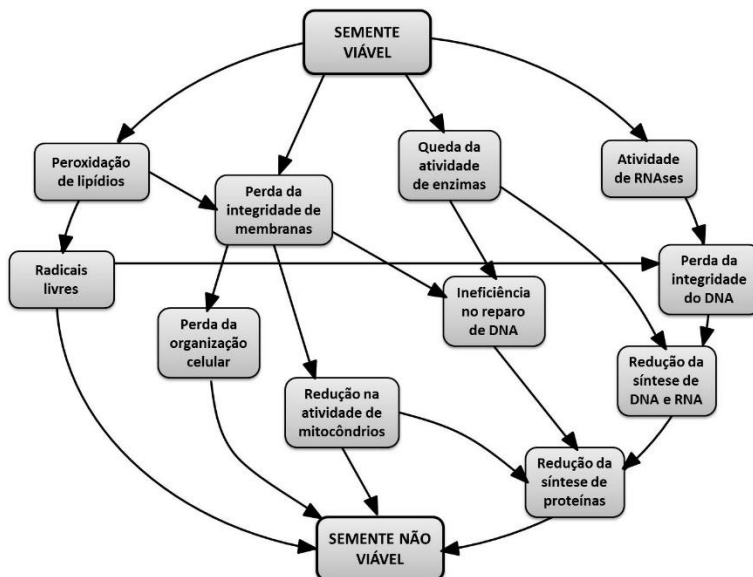


Figura 6 – Eventos metabólicos que ocorrem durante a deterioração da semente. Adaptado de Osborne, 1980.

Estes eventos podem ter maior ou menor importância em determinadas situações e alguns podem simplesmente não ocorrer para algumas espécies. Para as sementes recalcitrantes, embora tenha sido esporadicamente sugerido que a redução do teor de água a níveis que permitam o metabolismo basal, mas que impeçam a germinação no armazenamento pode ser uma maneira eficaz para aumentar a sua longevidade, existem evidências de que isso é de fato prejudicial e pode reduzir a qualidade e longevidade das sementes, pois uma desidratação leve pode estimular a germinação (BERJAK; PAMMENTER, 2008; DREW; PAMMENTER; BERJAK, 2000).

A seguir, serão discutidos alguns dos principais eventos da deterioração em sementes que resultam na perda de sua qualidade, suas evidências e possíveis causas buscando a compreensão entre a sutil mudança no metabolismo que determina a germinação ou a deterioração de sementes.

3.6.1 Danos ao sistema de membranas celulares

As membranas celulares são compostas por duas camadas de fosfolipídios com proteínas encaixadas como glóbulos (MARCOS

FILHO, 2005), seguindo o modelo mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson (1972). O sistema de membranas se organiza durante a maturação e a máxima organização é alcançada durante a fase final do acúmulo de reservas, próximo à maturidade fisiológica (MARCOS FILHO, 2005). Sua organização se mantém estável graças à relação entre seus componentes e a água (MATTHEWS, 1985).

A desorganização do sistema de membranas é o principal sintoma fisiológico da deterioração de sementes (COOLBEAR, 1995). O vazamento de solutos de baixo peso molecular (açúcares, íons, aminoácidos, etc.) ocorre durante a embebição e está associado com a fase de transição das membranas do estado gel para o estado cristalino líquido (COOLBEAR, 1995; MARCOS FILHO, 2005). O grau de lixiviação está correlacionado ao tempo utilizado para completar a fase de transição e aumenta ao longo da deterioração, sendo um indicador de vigor da semente (CORBINEAU, 2012; MATTHEWS; POWELL, 2006). Assim, sementes de menor qualidade estão, geralmente, associadas com elevado vazamento de solutos durante a fase de embebição.

Durante o armazenamento, as sementes perdem gradativamente a integridade do sistema de membranas. Suas possíveis causas estão relacionadas à redução da eficiência dos mecanismos de reparo, peroxidação de lipídios, dessecação excessiva, redução dos teores de açúcares e ação de radicais livres (COOLBEAR, 1995). Durante o estresse hídrico que pode ocorrer no armazenamento, a presença de certos solutos (como açúcares) em células tolerantes mantêm a superfície da célula hidratada e podem inclusive substituir as moléculas de água internamente às células, impedindo a fusão de membranas, o que não ocorre em células não tolerantes (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

3.6.2 Danos oxidativos resultantes da presença de Espécies Reativas do Oxigênio

O oxigênio molecular (O_2) é relativamente não reativo em seu estado base, e sob condições respiratórias normais a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS ou ROS) nas células ocorre em pequena intensidade. A redução do O_2 dá origem ao superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ao radical hidroxila ($\bullet OH$) e ao oxigênio singleto (O_2^1) (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; VENTURA et al., 2012). Condições adversas como as decorrentes do processo de deterioração podem levar ao rompimento da homeostase

celular e aumentar a produção de ROS, levando ao estresse oxidativo (ARRUDA; AZEVEDO, 2009; BOARETTO et al., 2014; GRATÃO et al., 2005).

O estresse oxidativo ocorre essencialmente como uma consequência de um desequilíbrio entre a produção de ROS e a atividade das defesas antioxidantes (ARRUDA et al., 2013; GRATÃO et al., 2012; KIBINZA et al., 2011) e podem modificar e inativar proteínas, lipídios, carboidratos, DNA e RNA, induzir disfunções celulares e, em última instância, provocar a morte celular (Figura 7) (GILL; TUTEJA, 2010; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; SCANDALIOS, 2005). A degradação do sistema de síntese de novas enzimas também está diretamente ligada à produção de ROS, afetando a formação de enzimas e promovendo modificações em sua estrutura (MARCOS FILHO, 2005).

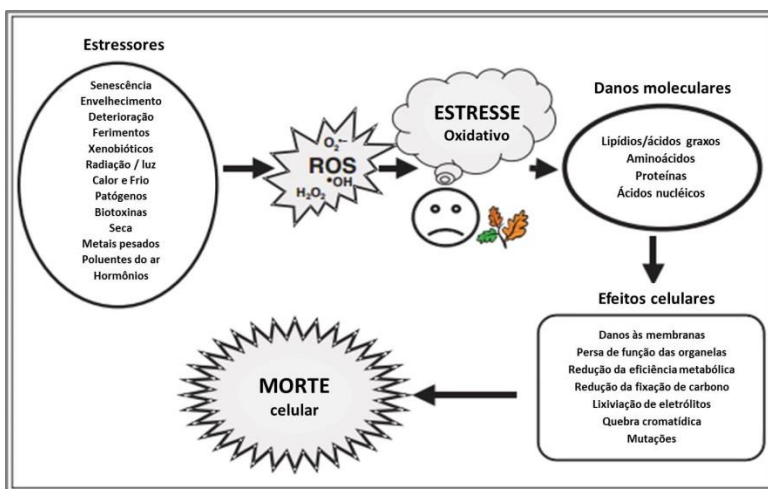


Figura 7 – Representação de alguns estressores ou iniciadores de espécies reativas do oxigênio (ROS) e as consequências biológicas que conduzem a uma variedade de disfunções fisiológicas que podem conduzir à morte celular. Adaptado de Scandalios, 2005.

A presença de ROS também pode desencadear reações oxidativas em cadeia altamente prejudiciais, especialmente com ácidos graxos poliinsaturados como o ácido linoléico para formar hidroperóxidos de lipídios (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; COOLBEAR, 1995; SHIN; KIM; AN, 2008). Para cada molécula de hidroperóxido formada, há a produção de um radical livre, capaz de reagir com outra molécula

lipídica (COOLBEAR, 1995). A peroxidação dos lipídios das membranas tem sido considerada um dos mecanismos mais importantes da deterioração de sementes e redução da capacidade germinativa (COOLBEAR, 1995; MCDONALD, 1999; VILLELA; PERES, 2004).

A peroxidação ocorre nos lipídios de reserva e nos componentes das membranas de sementes armazenadas, gerando um aumento nos radicais livres, formando produtos secundários tóxicos, promovendo a perda da permeabilidade seletiva e a desestruturação do sistema de membranas, a oxidação de aminoácidos, e a degradação de DNA e de proteínas (MARCOS FILHO, 2005; WILSON; MCDONALD, 1986). Portanto, a peroxidação lipídica é, provavelmente, a maior consequência da ação deletéria das ROS (HALLIWELL, 2012), e constitui um dos fatores que mais influenciam o declínio de vigor e viabilidade das sementes (JOSÉ et al., 2010; MARCOS FILHO, 2005; MINATO et al., 2005; WILSON; MCDONALD, 1986).

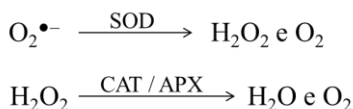
Apesar de sua ação deletéria, tem sido sugerido que a presença de ROS tem uma função regulatória na germinação e na dormência primária em sementes. A produção de ROS parece desencadear uma sequência de eventos em vários compartimentos celulares, os quais culminam na germinação (LEYMARIE et al., 2011). Portanto, as ROS são componentes chave das vias de transdução de sinais em sementes e tem sido relatado que a germinação de sementes somente pode ser completada se o conteúdo de ROS for mantido abaixo de um limiar crítico ('oxidative window for germination') (VENTURA et al., 2012). Além disso, parece haver uma relação entre as vias de sinalização induzidas pelas ROS e o metabolismo de ácido abscísico (ABA) e/ou giberelina (GA), sendo assim determinantes no controle da germinação e dormência (BAZIN et al., 2011; VENTURA et al., 2012).

3.6.3 Alterações nos sistemas enzimáticos antioxidantes

A célula vegetal, assim como seus peroxissomos, cloroplastos e mitocôndria, contém múltiplos sistemas enzimáticos para a remoção das ROS (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Estas enzimas atuam como antioxidantes que, quando presentes em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera-o ou previne significativamente a sua oxidação (HALLIWELL, 2012).

Para controlar os danos celulares induzidos pela presença de ROS, as sementes desenvolveram mecanismos de detoxificação, incluindo os compostos por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX),

glutathiona peroxidase (GSHPx), glutathiona redutase (GSSGR), monodeidroascorbato redutase (MDHAR) e deidroascorbato redutase (DHAR) (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008). Alguns destes sistemas como a SOD e a CAT, por exemplo, atuam como detoxificadores do agente, antes que a lesão seja provocada, buscando neutralizar as ROS (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A SOD atua na dismutação do $O_2^{\bullet-}$; já CAT e APX atuam na dismutação do H_2O_2 :



Em condições metabólicas normais, a formação e a remoção de ROS estão em equilíbrio (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). O balanço entre a produção de ROS e a atividade destes sistemas de remoção determinam o tipo e a concentração de ROS presente nas células, indicando a ocorrência e extensão dos danos (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Assim, os mecanismos enzimáticos de proteção atuam durante o armazenamento das sementes, quando há o avanço no processo deteriorativo (NAKADA et al., 2010), mas o potencial de detoxificação pode ser fortemente alterado se estes mecanismos sofrerem danos durante o armazenamento da semente, levando a uma redução no vigor e viabilidade (RAJJOU; DEBEAUJON, 2008). Alterações em sua estrutura e inativação progressiva das enzimas são algumas das evidências de danos no sistema antioxidante (COOLBEAR, 1995). Quando estes danos se acumulam a níveis perigosos, as sementes perdem a capacidade de remover as ROS e podem não suportar o reinício do metabolismo que ocorre durante a germinação das sementes (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; RAJJOU; DEBEAUJON, 2008).

3.6.4 Alterações no metabolismo de componentes de reserva

As reservas acumuladas durante o desenvolvimento da semente influenciam diretamente o vigor e o potencial de armazenamento (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012), pois são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular durante períodos de mais baixa atividade metabólica, além de determinar os procedimentos pós-colheita mais adequados à manutenção da qualidade das sementes (MARCOS FILHO, 2005). Os carboidratos desempenham papel fundamental na

manutenção da viabilidade das sementes durante o armazenamento, através dos mecanismos de embebição de água, proteção do embrião contra o dessecamento e o ataque de patógenos (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Os açúcares atuam como solutos compatíveis durante a fase inicial da dessecação em sementes ou em situações de estresse hídrico, substituindo a água nas células, estabilizando as macromoléculas e contribuindo para o estado vítreo (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Durante a deterioração das sementes, o decréscimo no teor de açúcares solúveis e totais pode afetar sua mobilização dos tecidos de reserva para o eixo embrionário, culminando em queda da germinação e do vigor (MARCOS FILHO, 2005). Entretanto, tem sido relatado que, para as sementes de *A. angustifolia*, a perda de viabilidade é acompanhada por aumentos nos açúcares totais, resultantes da degradação do amido, cujo teor decresce durante o armazenamento, provavelmente pelo seu consumo como substrato respiratório (RAMOS; SOUZA, 1991). Mas em trabalho prévio, foi possível observar redução no teor de carboidratos solúveis e amido em embriões de *A. angustifolia* durante o armazenamento por 180 dias em ambiente de laboratório sem controle térmico (ARALDI; COELHO; MARASCHIN, 2016).

As alterações no metabolismo de reservas durante a deterioração de sementes também se manifestam no teor de proteínas, que atuam nas sementes como substâncias de reserva e catalisam reações químicas (MARCOS FILHO, 2005). Ramos e Souza (1991), entretanto, não verificaram relação entre o teor de proteínas e a perda de viabilidade das sementes de *A. angustifolia*. Mas durante o armazenamento por 180 dias em ambiente em ausência de controle térmico observou-se redução progressiva no teor de proteínas solúveis, assim como alterações no perfil eletroforético (ARALDI; COELHO; MARASCHIN, 2016). Entretanto, a deterioração e a consequente redução do vigor das sementes também está relacionada à integridade do sistema de síntese de componentes de reserva e alterações na taxa respiratória (COOLBEAR, 1995).

Como descrito anteriormente, eventos decorrentes do processo germinativo parecem iniciar logo após a dispersão das sementes, incluindo um aumento nos níveis de síntese proteica e metabolismo de células meristemáticas (FARRANT; PAMMENTER; BERJAK, 1989). Portanto, as alterações bioquímicas observadas após a colheita podem não ser uma consequência de processo de deterioração, necessitando de mais estudos para a sua correta interpretação.

4. REFERÊNCIAS

- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, 2002.
- AMARANTE, C. V. T. et al. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 346–351, 2007.
- ANDRÉO, Y.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, C. J. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 2, p. 309–318, 2006.
- ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 4, p. 211–218, 2010.
- ARALDI, C. G.; COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M. Metabolic profile of Brazilian pine embryos and megagametophyte of stored seeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. no prelo, 2016.
- ARRUDA, M.; AZEVEDO, R. A. Metallomics and chemical speciation: towards a better understanding of metal-induced stress in plants. **Annals of Applied Biology**, v. 155, p. 301–307, 2009.
- ARRUDA, S. et al. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes. **Journal of Proteomics**, v. 93, p. 107–116, 2013.
- BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes: II - citros. **Bragantia**, v. 17, n. 11, p. 157–166, 1958.
- BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 10, p. 806–814, 2008.
- BARBEDO, C. J.; CICERO, S. M. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**, v. 28, p. 793–808, 2000.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botânica Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 145–164, 1998.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BAZIN, J. et al. Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. **The Plant cell**, v. 23, n. 6, p. 2196–208, jun. 2011.

BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. . The basis of recalcitrant seed behavior – cell biology of the homohydrous seed conditiions. In:

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, p. 213–228, 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. 478, p. 1–9, 2013.

BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Efeito da temperatura de secagem sobre o poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 2, p. 27–39, 1981.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179–194, 2003.

BOARETTO, L. F. et al. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 165–175, 2014.

BONJOVANI, M. R.; BARBEDO, C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. affinis (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 345–356, 2008.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 6, de 26 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Disponível em: <<<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf>>>.

BRUGGINK, T.; VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, v. 5, p. 1–4, 1995.

CAÇOLA, Á. V. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de

armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 391–398, 2006.

CARDOSO, V. J. . Germinação. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). . **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 386–408.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15–25, 2006.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5. ed. Campinas: Fundação Cargill, 2012.

CARVALHO, P. E. . **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa, 1994.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; F. BORGHETTI (Eds.). . **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149–162.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). . **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: The Haworth Press Inc, 1995. p. 223–177.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, v. 22, p. S61–S68, 2012.

CUNHA, R. DA et al. Efeito do dessecamento sobre a viabilidade de sementes de *Virola surinamensis* (Rol) Warb. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 69–72, 1992.

DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. Lavras: UFLA, 2008.

DREW, P. J.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. “ Sub-imbibed ” storage is not an option for extending longevity of recalcitrant seeds of the tropical species *Trichilia dregeana*. **Seed Science Research**, v. 10, n. 3, p. 355–363, 2000.

DURE, L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* 3:363–369, 1993.

EIRA, M. T. S. DA et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes

de *Araucaria angustifolia* (BERT.) O. KTZE - Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71–75, 1994.

ELBL, P. et al. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 3, p. 903–915, 2015.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 230, p. 1167–1174, 1990.

ESPINDOLA, L. S. et al. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, v. 4, p. 193–201, 1994.

FARIA, J. M. R. et al. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 418, p. 2119–30, 2005.

FARIAS-SOARES, F. L. et al. Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos. **Protoplasma**, v. 250, n. 4, p. 911–918, 2013.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. **Physiologia Plantarum**, v. 67, n. 2, p. 291–298, 1986.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Recalcitrance - a current assessment. **Seed science and technology**, v. 16, n. JANUARY, p. 155–166, 1988.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, p. 189–198, 1989.

FERREIRA, A. G. Aspectos estruturais de las semillas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Iheringia. Série Botânica**, p. 3–7, 1981.

FERREIRA, A. G.; HANDRO, W. Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 2, p. 7–13, 1979.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61–68, 1997.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A.; ZANON, A. Conservação de sementes de pinheiro-do-Paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens. **Comunicado Técnico - Embrapa**, v. 34, p. 1–4, 1998.

GARCIA, C. et al. Alterações no perfil proteico em sementes de ***Araucaria angustifolia*** durante a maturação e sua relação com a viabilidade. **Magistra**, v. 24, n. 4, p. 263–270, 2012.

GARCIA, C. et al. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. **Ciencia Florestal**, v. 24, n. 4, p. 857–866, 2014.

GARCIA, C. et al. Biochemical changes in *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) zygotic embryos during the storage. **Revista de Biologia Tropical**, v. 63, n. 4, p. 1185–1196, 2015.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 48, n. 12, p. 909–30, dez. 2010.

GOODMAN, R. C.; JACOBS, D. F.; KARRFALT, R. P. Evaluating desiccation sensitivity of *Quercus rubra* acorns using X-ray image analysis. **Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere**, v. 35, p. 2823–2831, 2005.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481–494, 2005.

GRATÃO, P. L. et al. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 79–96, 2012.

GUERRA, M. P. et al. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: L., S. L.; LINO, C. F. (Eds.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. 2. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 85–102, 2003.

GUERRA, M.P. et al. Araucária: Evolução, ontogênese e diversidade genética. In: BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. (Orgs.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 149–184, 2008.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637–644, 2012.

HIRANO, E. **Maturação fisiológica, tolerância à dessecação e conservação de sementes de lauráceas da Mata de Araucária de Santa Catarina.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2004.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour.** Rome: IPGRI, 1996.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Armazenamento de sementes de girassol em temperaturas subzero: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 29–38, 2010.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, v. 181, n. 3, p. 309–15, set. 2011.

LEYMARIE, J. et al. Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. **Plant & cell physiology**, v. 53, p. 96–106, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787–796, 2004.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas** Piracicaba Fealq, , 2005.

MATTHEWS, S. Physiology of seed aging. **Outlook on Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 89–94, 1985.

MATTHEWS, S.; POWELL, A. Electrical conductivity vigour test: physiological basis and use. **Seed Science**, v. 131, p. 32–35, 2006.

MATTOS, J. R. **O Pinheiro Brasileiro.** Florianópolis: UFSC, 2011.

MCDONALD, M. . Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177–237, 1999.

MINATO, K. et al. Accumulation of Nepsilon-(Hexanoyl)lysine, an oxidative

stress biomarker, in rice seeds during storage. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1806–1810, 2005.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual review of plant biology**, v. 58, p. 459–481, 2007.

MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E.J.B.N. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. seeds. **Scientia Agricola**, v. 60, n.2, p. 389–391, 2003.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853 - 858, 2000.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 42–51, 2010.

OBROUCHEVA, N. V. et al. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination. **AoB PLANTS**, v. 12, p. 1–14, 2012.

PAMMENTER, N. W. et al. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? **Seed Science Research**, v. 4, p. 187–191, 1994.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, v. 9, p. 13–37, 1999.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of Recalcitrant Seed Physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 56–69, 2000.

PANZA, V. et al. Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 273–281, 2002.

PÉREZ, H. E.; HILL, L. M.; WALTERS, C. An analysis of embryo development in palm: interactions between dry matter accumulation and water relations in *Pritchardia remota* (Arecaceae). **Seed Science Research**, v. 22, p. 97–111, 2012.

PIRIZ CARRILLO, V. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 411–42, 2003.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. 2. ed. Brasília: AGIPLAN, 1985.

RAJJO, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 796–805, 2008.

RAMOS, A.; SOUZA, G. B. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 22/23, p. 21–27, 1991.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499–514, 1973.

ROBERTS, E. H. Physiology of aging and its application to drying and storage. **Seed Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 359–372, 1981.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005.

SERSHEN et al. Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress-A case study on two amaryllid species. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 999–1011, 2012.

SETOGUCHI, H. et al. Phylogenetic relationships within araucariaceae based on rbcL gene sequences. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 11, p. 1507–1516, 1998.

SHIBATA, M. et al. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at different stages of development. **Seed Science and Technology** v. 41, p. 214–224, 2013.

SHIN, J.-H.; KIM, S.-R.; AN, G. Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability. **Plant Physiology**, v. 149, n. 2, p. 905–915, 2008.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720–731, 1972.

SOLÓRZANO FILHO, J. A. **Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kutze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2001.

SONG, S. Q. et al. Seed recalcitrance: a current assessment. **Acta Botanica**

Sinica, v. 45, n. 6, p. 638–643, 2003.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

SUITER FILHO, W. **Conservação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.** Piracicaba: ESALQ, 1966.

TARQUIS, A. M.; BRADFORD, K. J. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, n. 248, p. 307–317, 1992.

TAYLORSON, R. B. (Ed.). **Recent advances in the development and germination of seeds.** New York: Plenum Press., 1989. p. 89–108.

THOMAS, P. ***Araucaria angustifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species.** Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/32975/0>>.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Biology**, v. 105, p. 581–586, 1984.

VENTURA, L. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, p. 196–206, 2012.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.). **Seed Development and Germination.** New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p. 237–271.

VIBRANS, A.C. et al. How much remains of the Brazilian Atlantic forest in the state of Santa Catarina? Assessing the accuracy of forest cover maps using ground data from the Santa Catarina Forest and Floristic Inventory. **Remote Sensing of Environment**. No prelo. 2015.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 265–281.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, 2015.

WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. A. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. **Plant Science**, v. 179, p. 565–

573, 2010.

WILSON, D. O.; MCDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, v. 14, p. 296–300, 1986.

CAPÍTULO 1

pH EXUDATE TEST FOR DETERMINING THE VIABILITY OF *Araucaria angustifolia* SEEDS

Este capítulo foi publicado na Revista Floresta e Ambiente.

ARALDI CG, COELHO CMM. pH do exsudato na avaliação da viabilidade de sementes de *Araucaria angustifolia*. Floresta e Ambiente, v. 22 (3): 426-433. 2015.

Versão original disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.082314>

CAPÍTULO 1 – pH EXUDATE TEST FOR DETERMINING THE VIABILITY OF *Araucaria angustifolia* SEEDS

1.1 ABSTRACT

This study aimed to verify the efficiency of methods of pre-conditioning and periods of water immersion to perform the pH exudate test to evaluate the viability of *Araucaria angustifolia* seeds. Three pre-conditioning methods (whole seed, seed longitudinally sectioned, excised embryo) and three water imbibition periods (30, 60 and 90 minutes) were tested, and the solution color was evaluated. Additionally, the seeds were artificially aged for four and eight days at 40 °C. The viability was higher in embryos excised, after 30 minutes of imbibition, showing high coefficient of correlation with the germination and tetrazolium tests. Seeds at advanced stage of deterioration should be evaluated by associating the solution color with the tissue aspect. In conclusion, the pH exudate test is efficient to evaluate the viability of *A. angustifolia* seeds, and it should be performed using excised embryo imbibed in water for 30 minutes.

Keywords: Brazilian pine, longevity, recalcitrant seeds, seed conservation, seed development

1.2 REFERENCES

- Amaral AS, Peske ST. pH do exsudato para estimar, em 30 minutos, a viabilidade de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes* 1984; 6(3): 85-92.
- Amaral AS, Peske ST. Testes para avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de trigo. *Revista Brasileira de Agrociência* 2000; 6(1): 12-15.
- Balbuena TS, Jo L, Pieruzzi FP, Dias LLC, Silveira V, Santa-Catarina C et al. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 2011; 72(4-5): 302-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.12.007>. PMID:21276992.
- Barbieri APP, Menezes NL, Conceição GM, Tunes LM. Teste de lixiviação de potássio para a avaliação do vigor de sementes de arroz. *Revista Brasileira de Sementes* 2012; 34(1): 117-124. <http://dx.doi.org/10.1590/S010131222012000100015>.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. *Regras para análise de sementes*. Brasília: ACS; 2009.

- Cabrera AC, Peske ST. Testes do pH do exsudato para sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes* 2002; 24(1): 134-140.
- Carvalho JA, Von Pinho EVR, Oliveira JA, Guimarães RM, Bonome LT. Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Citromelo swingle*. *Revista Brasileira de Sementes* 2002; 24(1): 263-270.
- Fernandes EJ, Sader RJ, Carvalho NM. Viabilidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) estimada pelo pH do exsudato. *Revista Brasileira de Sementes* 1987; 9(3): 69-75.
- Fontes BPD, Davide LC, Davide AC. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. *Ciência e Agrotecnologia* 2001; 25(2): 346-355.
- Garcia C, Coelho CMM, Maraschin M, Oliveira LM. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. *Ciência Florestal* 2014; 24(4): 857-866. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509816586>.
- Hilst PC, Dias DCFS, Alvarenga EM, Souza BL. Test of exudates color hues for evaluating the physiological potential of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. *Revista Brasileira de Sementes* 2012; 34(2): 212-217. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222012000200004>.
- Krzyzanowski FC, Vieira RD, França Neto JB. *Vigor de Sementes: conceitos e testes*. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes; 1999.
- Lopes MM, Silva CB, Vieira RD. Physiological potential of eggplant seeds. *Journal of Seed Science* 2013; 35(2): 225-230. <http://dx.doi.org/10.1590/S2317-15372013000200012>.
- Maguire JD. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science* 1962; 2(2): 176-177. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X0002000200033x>.
- Matos JMM, Martins RCC, Martins IS. Caracterização do teste de pH de exsudato pelo método individual para avaliação da viabilidade de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Revista Heringeriana* 2009; 3: 81-87.
- Medeiros ACS, Abreu DCA. Desidratação ultra-rápida de embriões. *Pesquisa Florestal Brasileira* 2007; 54: 119-125. Moreira-Souza M, Cardoso EJBN. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. seeds. *Scientia Agricola* 2003; 60(2): 389-391. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162003000200025>.
- Muasya RM, Lommen WJM, Auma EO, Struik PC. Relationship between variation in quality of individual seeds and bulk seed quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed lots. *Wageningen Journal of Life Sciences* 2006; 54(1): 5-16. [http://dx.doi.org/10.1016/S15735214\(06\)80001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S15735214(06)80001-1).
- Oliveira LM, Gomes JP, Souza GK, Nicoletti MF, Liz TO, Pikart TG. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de

- Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Floresta e Ambiente* 2014; 21(4): 468-474. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.064413>.
- Ramos KMO, Matos JMM, Martins RCC, Martins IS. Electrical conductivity testing as applied to the assessment of freshly. *ISRN Agronomy* 2012; 2012: 1-5. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/378139>.
- Rech EG, Villela FA, Tillmann MA. Avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de ervilha. *Revista Brasileira de Sementes* 1999; 21(2): 1-9.
- Reis LS, Araújo EF, Dias DCFS, Sedyama CS, Meireles RC. LERCAFÉ: novo teste para estimar o potencial germinativo de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 2010; 32(1): 9-16.
- Santos JF, Alvarenga RO, Timóteo TS, Conforto EC, Marcos Filho J, Vieira RD. Avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes* 2011; 33(4): 743-751. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222011000400016>.
- Statistical Analysis System Institute – SAS. *SAS Institute Inc* 2009. Version 9.2. Cary; 2009.
- Schlögl PS, Souza AP, Nodari RO. PCR-RFLP analysis of non-coding regions of cpDNA in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Genetics and Molecular Biology* 2007; 30(2): 423-427. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572007000300020>.
- Shibata M, Coelho CMM, Steiner N. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at different stages of development. *Seed Science and Technology* 2013; 41(2): 214-224. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2013.41.2.04>.
- Tozzo GA, Peske ST. Qualidade fisiológica de sementes de soja comerciais e de sementes salvas. *Revista Brasileira de Sementes* 2008; 30(2): 12-18. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222008000200002>.

CAPÍTULO 2

ESTABLISHMENT OF POST-HARVEST EARLY- DEVELOPMENTAL CATEGORIES FOR VIABILITY MAINTENANCE OF *Araucaria angustifolia* SEEDS

Este capítulo foi publicado na Revista Acta Botanica Brasilica.

ARALDI, C.G.; COELHO, C.M.M. Establishment of post-harvest early-developmental categories for viability maintenance of *Araucaria angustifolia* seeds. Acta Botanica Brasilica, v. 29(4): 524-531. 2015.

Versão original disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-33062015abb0061>

CAPÍTULO 2 – ESTABLISHMENT OF POST-HARVEST EARLY-DEVELOPMENTAL CATEGORIES FOR VIABILITY MAINTENANCE OF *Araucaria angustifolia* SEEDS

2.1 ABSTRACT

Araucaria angustifolia seeds are recalcitrant, and their metabolism remains high during storage. This research aimed to describe the initiation of germination in *A. angustifolia* seeds during storage in order to standardize the assessment of physiological quality and to promote seed conservation. Seeds were collected from two populations and stored for 270 days in the natural laboratory environment and cold chamber. Seeds were classified according to four early developmental stages: I – mature seeds; II – seeds with elongation along the embryonic axis; III – beginning of root protrusion; IV – advanced germination stage, with seedling shoots. After categorization, physical and physiological quality was assessed. In freshly collected seeds, only category I was observed. At 270 days, approximately 40% of seeds were in category III in laboratory conditions, while the maintenance in a cold chamber delayed germinative metabolism. Viability tests showed that seeds in categories III and IV were more susceptible to damage caused by storage. In conclusion, the percentage of viable *A. angustifolia* seeds depends on the development stage after collection. Seeds that have reached early developmental category III should be prioritized for propagation, while those remaining in categories I and II should be longer stored with periodic assessment for reduction in physiological quality.

Keywords: Brazilian pine, longevity, recalcitrant seeds, seed conservation, seed development

2.2 INTRODUCTION

Araucaria angustifolia (Brazilian pine) is a key species of the Brazilian Atlantic Rain Forest (Veloso *et al.* 1991; Coutinho & Dillenburg 2010), being its only native gymnosperm of economic importance (Silveira *et al.* 2008; Elbl *et al.* 2014). Its seeds are consumed by humans and are the most important food source for several wild mammals and birds during the winter (Stefenon *et al.* 2009; Reis *et al.* 2014). The seeds are recalcitrant, with a short conservation period under natural conditions, with at least a 60% viability reduction at 4

months post-harvest (Fowler *et al.* 1998; Amarante *et al.* 2007; Garcia *et al.* 2014). Given the need for the conservation of genetic resources, it is important to note that *A. angustifolia* has been classified as critically endangered by IUCN (2013).

Studies on the metabolism of recalcitrant seeds have been performed by several authors (Barbedo & Bilia 1998; Song *et al.* 2003; Berjak & Pammenter 2008; Caccere *et al.* 2013; Pammenter & Berjak 2014; Walters 2015), including studies on *ex situ* conservation by storage (Pammenter *et al.* 1994; Drew *et al.* 2000; Li & Pritchard 2009; Pasquini *et al.* 2012; Charloq *et al.* 2013; Walters *et al.* 2013; Bonjovani & Barbedo 2014; Liu *et al.* 2014). Storage of recalcitrant seeds under desiccating conditions resulted in the initiation of subcellular damage, which may be repaired when seeds are set-out to germinate (Farrant *et al.* 1989; Tarquis & Bradford 1992). However, when a critical proportion of cells are damaged, there will be total viability loss (Farrant *et al.* 1989). Storage is possible if the conditions preclude water loss, but such hydrated storage is strictly a short-term option because it will also promote germination metabolism with an accompanying increase in respiratory metabolism, favor a microbial contamination, and cause damage if water is not supplied in appropriate amounts (Farrant *et al.* 1989; Pammenter *et al.* 1994; Barbedo & Marcos Filho 1998; Drew *et al.* 2000; Berjak & Pammenter 2013). Therefore, high humidity also promotes the deterioration process (Barbedo & Cicero 2000).

Some researchers have reported the early germination of *A. angustifolia* seeds during storage (Farrant *et al.* 1989; Garcia *et al.* 2014). Subcellular germination events, including an increase in the levels of protein synthesis and meristem cell metabolism, initiate shortly after the seeds of *A. angustifolia* are shed, and continue on during storage (Farrant *et al.* 1989).

Recalcitrant seed quality is influenced by drying after harvest, genetic potential, environmental conditions, harvest date, mechanical damage, and storage conditions (Demir *et al.* 2008; Ligterink *et al.* 2012), and the determination of seed quality is a critical step for conservation, cultivation, breeding and research activities (Corbineau 2012). However, studies evaluating the quality of recalcitrant seeds, in general, do not consider the fact that germination metabolism may be active, and so assess seed quality in a manner similar to that done for more orthodox seeds.

Some authors have evaluated the decline in physiological quality of *A. angustifolia* seeds during storage (Fowler *et al.* 1998; Fontes *et al.* 2001; Piriz Carrillo *et al.* 2003; Caçola *et al.* 2006; Amarante *et al.*

2007; Garcia *et al.* 2014). However, there have been no published reports on the characterization and standardization of germination metabolism after harvest, which begins immediately after physiological maturity and thus prior to quality evaluation. In view of the intraspecific variation typical of recalcitrant seeds (Li & Pritchard 2009), a standardized assessment of physiological quality is necessary in order to determine a seeds developmental stage (Shibata *et al.* 2013). Thus, the aim of this work was to standardize the assessment of physiological quality of *Araucaria angustifolia* by identifying the initiation of the germination process during storage and to categorize seeds according to early developmental stage. More specifically the present study aimed to identify what stage of early development allows for the longest storage period, thus promoting seed conservation and providing a basis for further research on physiological quality of recalcitrant species.

2.3 MATERIAL AND METHODS

2.3.1 Plant material

Mature cones of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze were collected in May 2012 from two natural populations: Lot 1 from the region of São José do Cerrito (27°36' S, 50°39' W, average elevation of 918 meters); and Lot 2 from Paineal (27°55' S, 50°04' W, average elevation of 1171 meters), both in the state of Santa Catarina in southern Brazil. Both populations are located in areas of secondary forest (Mixed Rain Forest), with temperate Cfb climate according to Köppen classification, and relief from flat to slightly rolling. Cones were collected from 15 ± 2 matrices/population, for a total of 65 ± 2 cones/population. The collection of samples from two different populations was intended to better represent the species given the typical intraspecific diversity of recalcitrant seeds, and thus provide a stronger hypothesis test.

2.3.2 Seed storage and determination of physiological quality

Seed samples were homogenized and distributed among four replicates per lot, from which fractions were withdrawn and placed in sealed, semipermeable (porosity of 0.015 μm), transparent plastic containers which permitted gaseous exchange yet limited water loss. The containers were then placed in two different storage conditions: the natural laboratory environment, and a cold chamber (temperature of 10

$\pm 3^{\circ}\text{C}$, and relative humidity of $45 \pm 5\%$), where they were kept for a period of 270 days (each storage condition containing the four replicates per lot). Reference values for storage temperature and relative humidity for the natural laboratory environment are listed in Table 2.1.

Tabela 2.1 – Reference temperature and relative humidity data for the city of Lages, SC, during storage of *Araucaria angustifolia* seed lots, according to Epagri/Ciram (2014).

Storage Period (days)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)			Relative humidity (%)		
	Mean	Maximum	Minimum	Mean	Maximum	Minimum
15 – 30	13.3	24.8	0.9	83	98	35
45	12.4	24.3	0.4	85	98	41
90	11.7	24.0	-0.5	85	98	43
135	12.4	24.4	1.1	85	98	43
180	13.4	26.0	1.6	83	98	42
225	14.1	26.0	2.4	82	98	43
270	15.5	27.0	4.3	81	98	42

Prior to assessment of quality, seeds were categorized according to early developmental stage. Determination of early developmental stage, and tests of moisture content, viability and vigor were performed at zero, 15, 30, 45, 90, 135, 180, 225 and 270 days, for both lots and both storage conditions.

2.3.3 Categorization of early developmental stages

In order to standardize the assessment of viability and vigor, 35 seeds/replicate were assessed from both lots and both storage conditions. Seeds were separated into early developmental stages by visual characterization of seeds and/or embryos, which were manually extracted using a stylus and scalpel. This analysis allowed grouping seeds into four distinct categories (Fig. 2.1):

- Category I: seeds with mature (but not germinated) embryos, with whitish, pinkish or greenish cotyledons (Fig. 2.1 A-B);
- Category II: seeds with embryos showing apparent elongation along the embryonic axis, indicating the beginning of germination (Fig. 2.1 C-D);
- Category III: seeds with embryos that started root protrusion, with seed coat rupture, and hypocotyl thickening; in general the cotyledons are greenish (Fig. 2.1 E-F);

– Category IV: seeds with embryos in advanced stages of germination, with seedling shoots; cotyledons present, and the primary root being brownish (Fig. 2.1 G-H).



Figura 2.1 – Appearance of *Araucaria angustifolia* seeds and embryos at early developmental stages I (A, B), II (C, D), III (E, F) and IV (G, H), observed

during the storage period, showing cotyledons (c) and embryonic axes (ea). Bars indicate 1 cm.

In addition to visual analysis, embryo mass was determined using 10 seeds/replicate for each condition and storage period. Embryos were then extracted and categorized according to early developmental stage. Mean embryo mass was determined for each category, as was the percentage of seed mass represented by the embryo, regardless of the condition and storage period, in order to better characterize early developmental stages.

2.3.4 Seed quality analysis during storage

Moisture content was assessed through weight loss after oven drying at $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, using three transversely cut seeds/replicate, (Brazil 2009). For analysis of seed viability, the Rules for Seed Analysis – RAS were used (Brazil 2009), which recommend the use of the tetrazolium test instead of the germination test, because of the extensive time-period before the formation of normal seedlings.

Therefore, viability was assessed using the tetrazolium test on 25 embryos/replicate, (according to methodology of Brazil 2009, with adaptations by Oliveira *et al.* 2014), and exudate pH, according to methodology of Araldi *et al.* (2015). Both viability tests were based on the identification of viable structures associated with tissues appearance. An electrical conductivity test was performed with 10 embryos/replicate immersed in 75 ml of ultrapure water where they were kept for 12 hours at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, and the results reported in $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Medeiros & Abreu 2007).

Seeds from all categories were used for analysis of seed quality, however, only categories I and II will be presented in the results of viability analysis (tetrazolium and exudate pH exudate), since these categories better exhibited the differences between storage conditions and had a less substantial decline in viability.

2.3.5 Experimental design and statistical analysis

The experiment was conducted using a completely randomized design in split plot, with two storage conditions (natural environment and cold chamber) and nine storage periods (0, 15, 30, 45, 90, 135, 180, 225 and 270 days). Percentage data were transformed into $\text{arc sin } \sqrt{\%}$. Analysis of variance, Tukey test of means at 5% probability, and

regression analysis were performed using the statistical program SAS (2009). Since there were no significant differences between seed lots, viability analyses (tetrazolium and exudate pH), moisture content and electrical conductivity were presented as a function of lot average.

2.4 RESULTS

2.4.1 Early development of seeds during storage

The four early-developmental categories showed pronounced differences in embryo mass. Embryos belonging to category I averaged 0.12 g (Lot 1) and 0.14 g (Lot 2), representing 1.35% of the total seed mass (Table 2.2). There was an increase in embryo mass in category II (0.25 and 0.22 g, for Lots 1 and 2, respectively) and category III (0.87 and 0.82 g, for Lots 1 and 2, respectively). However, after root protrusion, embryo mass-gain was much higher, with it reaching close to 50% of total seed mass (Table 2.2).

Tabela 2.2 – Embryo mass and relative percentage of total seed mass according to early developmental stage of *Araucaria angustifolia*.

	Early developmental category	Mass/embryo (g)	% relative to the seed total weight
Lot 1	I	0.12	1.35
	II	0.25	3.06
	III	0.87	10.39
	IV	2.98	48.64
CV (%)		26	30
Lot 2	I	0.14	1.35
	II	0.22	2.31
	III	0.82	11.11
	IV	3.25	47.12
CV (%)		31	29

Mass per embryo refers to the overall mean of embryos of each category, regardless of the condition and period of storage.

In freshly collected seeds, only embryos in category I were observed (Table 2.3). After 30 days of storage, embryos were found to be in categories II and III for both lots, and a decrease in the percentage of embryos in category I. After 45 days the percentage of embryos in category III increased substantially, with values close to 40% at 270

Tabela 2.3 – Percentage of *Araucaria angustifolia* seeds in early developmental categories I, II, III and IV, observed during storage in the natural laboratory environment and cold chamber.

S.C.	E.D.	Lot 1										Lot 2									
		Storage Period (days)																			
		0	15	30	45	90	135	180	225	270	0	15	30	45	90	135	180	225	270		
Natural Environment	I	100	100	89	84	42	31	22	49	38	100	98	90	72	49	20	40	46	28		
	II	-	-	9	8	15	17	9	5	7	-	1	6	14	15	11	8	8	11		
	III	-	-	2	8	43	48	55	40	39	-	1	4	14	36	48	39	41	41		
	IV	-	-	-	-	-	4	14	6	16	-	-	-	-	-	21	13	5	20		
CV (%)		0	0	18	17	18	24	26	28	27	0	1	3	12	12	26	22	20	13		
Cold Chamber	I	100	100	98	98	68	27	47	49	49	100	100	100	96	46	26	40	44	45		
	II	-	-	2	1	19	20	22	13	15	-	-	-	3	20	36	17	18	26		
	III	-	-	-	1	13	53	31	38	36	-	-	-	1	34	38	43	37	29		
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-		
CV (%)		0	0	2	1	10	17	27	26	21	0	0	0	7	13	28	22	25	27		

Being: S.C. – storage condition; E.D. – early developmental category

days for samples stored in the natural laboratory environment. The same trend was observed for the cold chamber samples, but with slightly lower percentages, approximately 33% of the embryos being in category III for both lots at 270 days, but embryos in category IV were not observed in the cold chamber.

The results show morphological changes typical of each early-developmental category, resulting in significant alterations in embryo mass, for all lots, conditions, and storage periods.

2.4.2 Seed quality after storage

Viability of embryos from freshly collected seeds, as determined by tetrazolium and exudate pH tests, was 96% and 95%, respectively (Fig. 2.2 A-B). Viability reduced sharply after 45 days of storage, and at the end of experimental period (270 days) viability was 4% (tetrazolium), and 5% (exsudate pH) for embryos stored at natural laboratory environment, and 9% (tetrazolium), and 13% (exsudate pH) for embryos stored in the cold chamber.

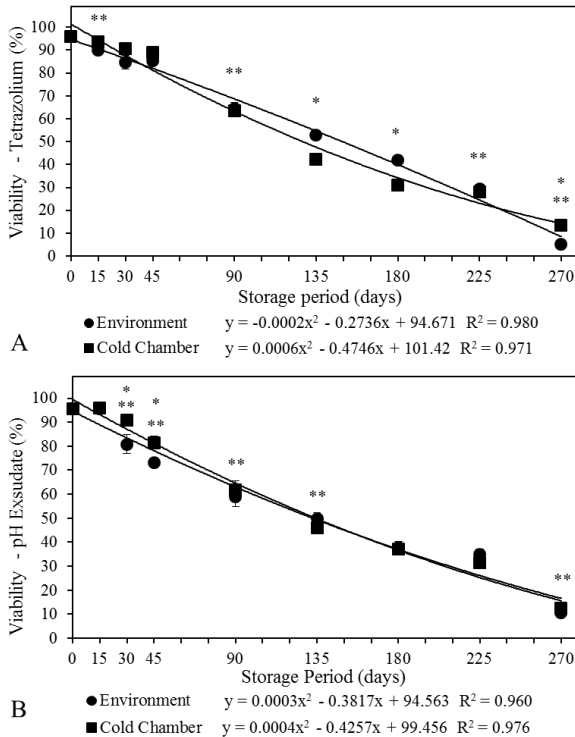


Figura 2.2 – Viability of *Araucaria angustifolia* embryos assessed by tetrazolium (A) and pH exudate tests (B) of freshly collected seeds, and seeds in storage in the natural environment and dry chamber. Values represent the mean of seed lots from 4 replications (n=25) for each treatment (from early developmental categories I and II), and vertical bars are the pooled standard errors of the mean (ANOVA). * indicates the presence of significant differences between the mean of at least one storage condition treatment ($P \leq 0.05$) in each storage period. ** indicates the presence of significant differences between the mean of the storage period treatment ($P \leq 0.05$) in relation to the previous period, for at least one storage condition.

Viability should be related to moisture content, especially in recalcitrant seeds. Freshly collected seeds showed 49.5% moisture, and these values decreased during storage (Fig. 2.3). The sharpest reductions in moisture content occurred after 180 days of storage (moisture below 38%), coinciding with the period in which embryo viability decreased to lower than 42% (tetrazolium) or 38% (exsudate pH) for both storage conditions (Fig. 2.2 A-B). At the end of the storage period (270 days),

moisture content of seeds reached 34% (natural environment), and 30% (cold chamber).

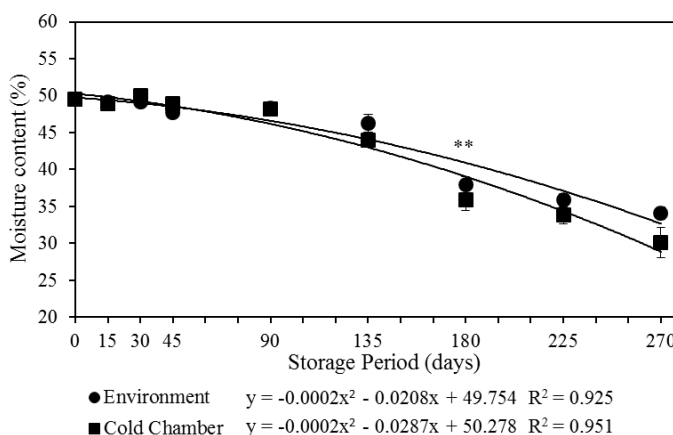


Figura 2.3 – Moisture content of seeds of *Araucaria angustifolia* freshly collected and in storage in the natural environment and cold chamber. Values represent the mean of seed lots from 4 replicates ($n=3$) for each treatment (from early developmental categories I, II, III and IV), and vertical bars are the pooled standard errors of the mean (ANOVA). * indicates the presence of significant differences between the mean of at least one storage condition treatment ($P \leq 0.05$) in each storage period. ** indicates the presence of significant differences between the mean of the storage period treatment ($P \leq 0.05$) in relation to the previous period, for at least one storage condition.

Differences in embryo vigor, as assessed by electrical conductivity, between storage conditions were pronounced. In freshly collected samples, electrical conductivity was $64.3 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$, and the most significant differences between storage conditions occurred after 180 days (Fig. 2.4). At 270 days, electrical conductivity was $140.3 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (natural environment), and $332.4 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (cold chamber).

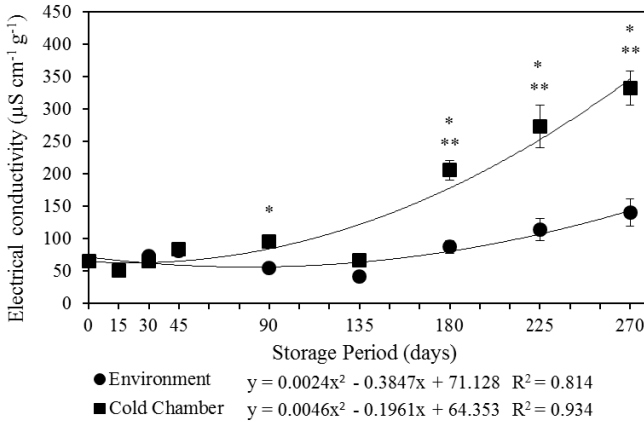


Figure 2.4 – Electrical conductivity of *Araucaria angustifolia* embryos from freshly collected seeds, and from seeds in storage in the natural environment and dry chamber. Values represent the mean of seed lots from 4 replicates ($n=10$) for each treatment (from early developmental categories I, II, III and IV), and vertical bars are the pooled standard errors of the mean (ANOVA). * indicates the presence of significant differences between the mean of at least one storage condition treatment ($P \leq 0.05$) in each storage period. ** indicates the presence of significant differences between the mean of the storage period treatment ($P \leq 0.05$) in relation to the previous period, for at least one storage condition.

2.5 DISCUSSION

Subcellular germination events of recalcitrant seeds initiate early after shedding (Drew et al. 2000; Obroucheva et al. 2012; Berjak & Pammenter 2013). In fact, a decrease in the percentage of embryos in category I was observed after only 30 days of storage of *A. angustifolia* seeds, which suggests that germination metabolism certainly starts prior to this period. Recalcitrant seeds, including *A. angustifolia*, stored for 28 days at high relative humidity show protein digestion resulting in the formation of several vacuoles, plastids devoid of starch, and an increase in the number of mitochondria, all indicative of increased respiratory activity (Farrant et al. 1989). Therefore, *A. angustifolia* seeds remain metabolically active, and show changes associated with the process of germination while stored, a characteristic that forms the basis of recalcitrant behavior (Pammenter & Berjak 2013).

In general, the percentage of embryos in category II was low in all treatments. This is because category II is a transition between the end

of embryonic development (mature but not germinated embryos, typical category I), and the early formation of seedlings (physiologically germinated embryos, typical category III). At the end of the experiment, most of the embryos that remained in categories I and II had deteriorated, being discolored and having visually softened tissue and/or damage from microorganisms. This is confirmed by results of the tests of physiological quality, which found a low percentage of viable seeds at 270 days of storage.

Viability decreased over the experimental period for both storage conditions, however, considering all early-developmental categories (I to IV), viability values were, on average, 10% lower than considering only categories I and II for all storage periods (data not shown). This indicates that embryos in categories III and IV were more susceptible to deterioration. Furthermore, a more significant reduction in viability occurred with about 10% water loss, which favors deterioration. Once germination starts during storage, when there is a gradual increase in metabolic activity and water is necessary to complete the process, recalcitrant seeds including those of *A. angustifolia*, become increasingly sensitive to drought stress, and the damage caused by the lack of water triggers deterioration (Farrant et al. 1989; Fowler et al. 1998; Pammenter & Berjak 2013; Walters 2015). Therefore, at the time when the water demand of seeds increased, it was also period of the lowest moisture levels, thus contributing to a sharp decline in viability. This makes it clear that the establishment of quality standards prior to physiological analysis is important for accurate assessment, and the segregation into early developmental categories should be considered. For seedling formation, seeds remaining in early developmental categories I and II can be kept in storage for future use, provided their physiological changes are periodically assessed during the storage period. Moreover, it is not possible to distinguish seeds in category I from those in category II without opening them and observing their embryos. Seeds with root protrusion (early developmental category III) should be used for propagation as quickly as possible. Following these measures would allow the most optimal storage and use of seeds of *A. angustifolia*.

The results presented herein suggest that heterogeneity in the degree of maturity of seeds is one of the most important aspects of determining the storability of *A. angustifolia* seed lots. Some authors have proposed that the period of viability of recalcitrant seeds during storage is dependent upon how developed the seeds are, considering that recalcitrant seeds differ from orthodox seeds only in the stage of

maturity at which they were disconnected from mother plant (i.e., recalcitrant are immature dispersed seeds, Barbedo et al. 2013). Besides, there is natural variation in seed longevity, and the assignment of seeds to particular categories based on seed responses at full maturity is a difficult task because many recalcitrant seeds lack a clear punctuation between maturation and germination (Berjak & Pammenter 2008; Walters 2015).

Decrease in embryo viability does not appear to have been strongly influenced by storage condition, possibly due to the use of sealed containers with small porosity that limited water loss. Furthermore, although there was a great temperature range in the natural laboratory environment, the average temperature in this condition (15°C) was only slightly higher than that of the cold chamber (10°C). More pronounced differences between storage conditions were observed in early developmental categories, wherein the samples in the natural laboratory environment reached categories II, III, and IV earlier than those in the cold chamber, since seeds of *A. angustifolia* germinated easily at temperatures ranging from 10°C to 30°C (Espíndola et al. 1994).

Electrical conductivity increased over the storage period and may be indicative of the onset of deterioration, given a lowered integrity of the cell membrane system of the seeds, which represents the initiation of the deterioration process (Matthews et al. 2012; Silva et al. 2014). The assessment of vigor using electrical conductivity showed a difference between storage conditions because the conductivity was higher in the cold chamber samples (lower vigor), compared to that of the samples in the natural laboratory environment (higher vigor), especially beginning at 135 days. Due to the sensitivity of the test, and since the natural laboratory environment condition had a higher average temperature and a higher temperature range than cold chamber, the laboratory environment samples were expected to have a higher rate of solute leaching. However, in the early developmental categories observed, the samples kept in the cold chamber had higher conductivity. This result can be explained by the correlation between physical characteristics and electrolyte leakage by seeds (Miceli & Miceli 2012).

The process of the digestion of reserves during the development of seedlings of *A. angustifolia* originates in the embryo (Rosado et al. 1994), which leads to several morphological changes after they reach early-developmental categories III and IV, such as the thickening of the hypocotyl and primary root. At the seedling stage, the primary root is well-developed, cylindrical, woody, rusty in color, and with longitudinal

ridges (Kuniyoshi 1983), and the hypocotyl is distinguished not only by the lack of lateral roots, but also by its extension, and its slightly greenish color (Dillenburg et al. 2010). Therefore, considering that seeds stored in the natural environment reached early developmental categories III and IV first, the morphological characteristics of developing seedlings provided a physical barrier preventing the leaching of solutes, and thus reducing electrical conductivity. Meanwhile, about 77% of seeds kept in the cold chamber were in categories I and II at 270 days (both lots), and thereby were more susceptible to solute leaching due to the disruption of the membrane system during the storage period. Thus, the electrical conductivity test was not sensitive enough to differentiate the physiological quality of seeds, unless their early developmental stages were previously established.

In summary, the results of this study demonstrate that the initiation of germination in stored seeds of *A. angustifolia* can be verified by visual analysis at about 30 days after collection. Seed storage in cold-chamber conditions delays germination, but does not prevent its occurrence. After reaching category III, embryos are more likely to deteriorate. Heterogeneity in the degree of maturation is one of the major causes of seed deterioration in *A. angustifolia*. Viability of *A. angustifolia* embryos can be kept around 12% after 270 days of storage in cold-chamber conditions. The lots of assessed seeds showed the same behavior with regard to physiological quality analysis, and were able to be separated into early developmental categories. Propagation purposes should prioritize the use of *A. angustifolia* seeds that have reached early developmental category III (with root protrusion), while those that remain in category I and II could be stored for 270 days in a cold chamber while maintaining at least 12% viability, provided there is periodic assessment for reduction in physiological quality.

2.6 REFERENCES

- Amarante CVT, Mota CS, Megguer CA, Ide GM. 2007. Conservação póscolheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. *Ciência Rural* 37: 346-351.
- Araldi CG, Coelho CMM. 2015. pH do exsudato na avaliação da viabilidade de sementes de *Araucaria angustifolia*. *Floresta e Ambiente* 22: 426-433.
- Barbedo CJ, Bília DAC. 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agrícola* 55: 121-125.

- Barbedo CJ, Centeno DC, Ribeiro RCLF. 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.
- Barbedo CJ, Cicero SM. 2000. Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. *Seed Science and Technology* 28: 793-808.
- Barbedo CJ, Marcos Filho J. 1998. Dessication tolerance in seeds. *Acta Botanica Brasilica* 12: 145-164.
- Berjak P, Pammenter NW. 2008. From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany* 101: 213-228.
- Berjak P, Pammenter NW. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-9.
- Bonjovani MR, Barbedo CJ. 2014. Induction of tolerance to desiccation and to subzero temperatures in embryos of recalcitrant seeds of *inga*. *Journal of Seed Science* 36: 419-426.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília, MAPA/ACS.
- Caccere R, Teixeira SP, Centeno DC, Figueiredo-Ribeiro RCL, Braga MR. 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology* 170: 791-800.
- Caçola A V, Amarante CVT, Fleig FD, Mota CS. 2006. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. *Ciência Florestal* 16: 391-398.
- Charloq, Lubis Z, Siregar TH, Elisa J, Sirait BA, Mathius NT. 2013. PEG 6000 ability test and fungicide efficacy in improving storability of shelled rubber (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg) seed. *Research Journal of Seed Science* 6: 40-48.
- Corbineau F. 2012. Markers of seed quality: from present to future. *Seed Science Research* 22: S61-S68.
- Coutinho AL, Dillenburg LR. 2010. Comparison of seedling growth among three co-occurring varieties of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze under greenhouse conditions. *Acta Botanica Brasilica* 24: 567-570.
- Demir I, Tekin A, Ökmen ZA, Okçu G, Kenanoglu BB. 2008. Seed quality, and fatty acid and sugar contents of pepper seeds (*Capsicum annuum* L.) in relation to seed development and drying temperatures. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 32: 529-536.

- Dillenburg LR, Rosa LMG, Mósena M. 2010. Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: an important underground sink of the seed reserves. *Trees Structure and Function* 24: 705-711.
- Drew PJ, Pammenter NW, Berjak P. 2010. ‘Sub-imbibed’ storage is not an option for extending longevity of recalcitrant seeds of the tropical species, *Trichilia dregeana* Sond. *Seed Science Research* 10: 355-363.
- Elbl P, Lira BS, Andrade SCS, *et al.* 2014. Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120: 903-915.
- Epagri/Ciram. 2014. Atlas climatológico do estado de Santa Catarina. Florianópolis, Epagri.
- Espíndola LS, Noin M, Corbineau F, Côme D. 1994. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Science Research* 4: 193-201.
- Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P. 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated species. *Planta* 178: 189-198.
- Fontes BPD, Davide LC, Davide AC. 2001. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. *Ciência e Agrotecnologia* 25: 346-355.
- Fowler JAP, Bianchetti A, Zanon A. 1998. Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens. EMBRAPA/CNPQ, Comunicado Técnico 34: 1-4.
- Garcia C, Coelho CMM, Maraschin M, Oliveira LM. 2014. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. *Ciência Florestal* 24: 857-866.
- IUCN. 2013. Red List of Threatened Species. International Union for the Conservation of Nature, Cambridge, United Kingdom.
- Kuniyoshi YS. 1983. Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária. Dissertation, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.
- Li DZ, Pritchard HW. 2009. The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science* 14: 614-621.
- Ligterink W, Joosen RVL, Hilhorst HWM. 2012. Unravelling the complex trait of seed quality: using natural variation through a combination of physiology, genetics and -omics technologies. *Seed Science Research* 22: S45-S52.

- Liu Q, Lan QY, Wen B, Tan YH, Wang XF. 2014. Germination of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds. *Science Asia* 40: 101-105.
- Matthews S, Noli E, Demir I, Khajeh Hosseini M, Wagner MH. 2012. Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. *Seed Science Research* 22: S69-S73.
- Medeiros ACS, Abreu DCA. 2007. Flash-drying for embryos desiccation. *Pesquisa Florestal Brasileira* 54: 119-125.
- Miceli A, Miceli C. 2012. Effect of thermal treatments on vitality and physical characteristics of bean, chickpea and lentil. *Journal of Stored Products Research* 51: 86-91.
- Obroucheva NV, Lityagina SV, Novikova GV, Sin'kevich IA. 2012. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination. *AoB Plants* 2012: 1-14.
- Oliveira LM, Gomes JP, Souza GK, Nicoletti MF, Liz TO, Pikart TG. 2014. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Floresta e Ambiente* 21: 468-4.
- Pammenter NW, Berjak P. 2013. Development of the understanding of seed recalcitrant and implications for *ex situ* conservation. *Bioteecnología Vegetal* 13: 131-144.
- Pammenter NW, Berjak P. 2014. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. *International Journal of Plant Sciences* 175: 21-28.
- Pammenter NW, Berjak P, Farrant JM, Smith MT, Ross G. 1994. Why do stored hydrated recalcitrant seeds die? *Seed Science Research* 4: 187-191.
- Pasquini S, Mizzau M, Petrussa E, *et al.* 2012. Seed storage in polyethylene bags of a recalcitrant species (*Quercus ilex*): analysis of some bio-energetic and oxidative parameters. *Acta Physiologia Plantarum* 34: 1963-1974.
- Piriz Carrillo V, Chaves A, Fassola H, Mugridge A. 2003. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. *Seed Science and Technology* 31: 411-421.
- Reis MS, Ladio A, Peroni N. 2014. Landscapes with *Araucaria* in South America: Evidence for a cultural dimension. *Ecology and Society* 19: 43-56.
- Rosado RM, Ferreira AG, Mariath JEA, Cocucci AE. 1994. Amido no megagametófito de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze: degradação durante a germinação e desenvolvimento do esporófito. *Acta Botanica Brasilica* 8: 35-43.

- SAS. 2009. SAS Institute Inc® 2009. Cary, NC, USA, Lic. UDESC: SAS Institute Inc.
- Shibata M, Coelho CMM, Steiner N. 2013. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at different stages of development. *Seed Science and Technology* 41: 214-224.
- Silva VN, Zambiasi CA, Tillmann MAA, Menezes NL, Villela FA. 2014. Condução do teste de condutividade elétrica utilizando partes de sementes de feijão. *Revista de Ciências Agrárias* 37: 206-213.
- Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena TS, *et al.* 2008. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* 52: 101-104.
- Song SQ, Berjak P, Pammenter N, Ntuli TM, Fu JR. 2003. Seed recalcitrance: a current assessment. *Acta Botanica Sinica* 45: 638-643.
- Stefenon VM, Steiner N, Guerra MP, Nodari RO. 2009. Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. *Biodiversity and Conservation* 18:2433-2448.
- Tarquis AM, Bradford KJ. 1992. Prehydration and priming treatments that advance germination also increase the rate of deterioration of lettuce seeds. *Journal of Experimental Botany* 43: 307-317.
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro, IBGE.
- Walters C. 2015. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242: 397-406.
- Walters C, Berjak P, Pammenter N, Kennedy K, Raven P. 2013. Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339: 915-916.

CAPÍTULO 3

**STORAGE POTENTIAL OF LOCAL VARIETIES OF
BRAZILIAN PINE SEEDS**

Este capítulo segue a formatação da Revista Floresta e Ambiente.
ARALDI CG, COELHO CMM, SHIBATA M. Potencial de armazenamento de
sementes de variedades locais de araucária. Floresta e Ambiente. 2016.

CAPÍTULO 3 – STORAGE POTENTIAL OF LOCAL VARIETIES OF BRAZILIAN PINE SEEDS

3.1 ABSTRACT

Brazilian pine seeds (*Araucaria angustifolia*) are recalcitrant, and there are no studies evaluating longevity of different varieties. The objective of this work was to evaluate seeds physiological quality of different varieties of Brazilian pine subject to storage. Seeds from varieties: *sancti josephi* (I), *angustifolia* (II), *caiova* (III) and *indehiscens* (IV), were collected from two populations located in Santa Catarina State, and stored at laboratory ambient and cold chamber by 90 days. Newly collected seeds showed, an average, 88% viability, and varieties II and III maintained higher viability (and higher vigor for variety II) at 90 days of storage. Varieties I and II maintained pre-germinative metabolism by higher period during storage. In conclusion, seeds of variety *angustifolia* (II) present storage potential for longer period than others, and maintain about 61% viability at 90 days of storage.

Keywords: viability, vigor, seed conservation.

3.2 REFERENCES

- Amarante CVT Do, Mota CS, Megguer CA and Ide GM (2007) Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. *Ciência Rural* 37(2): 346–351.
- Araldi CG and Coelho CMM (2015a) pH do Exsudato na Avaliação da Viabilidade de Sementes de *Araucaria angustifolia*. *Floresta e Ambiente* 22(3): 426–433.
- Araldi CG and Coelho CMM (2015b) Establishment of post-harvest early-developmental categories for viability maintenance of *Araucaria angustifolia* seeds. *Acta Botanica Brasilica* no prelo.
- Balbuena TS, Jo L, Pieruzzi FP, Dias LLC, Silveira V, Santa-Catarina C, Junqueira M, Thelen JJ, Shevchenko A and Floh EIS (2011) Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*. Elsevier Ltd 72(4-5): 302–311. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.12.007>.
- Caçola ÁV, Amarante CVT do, Fleig FD and Mota CS (2006) Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

- submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. *Ciência Florestal* 16(4): 391–398.
- Coutinho AL and Dillenburg LR (2010) Comparison of seedling growth among three co-occurring varieties of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze under greenhouse conditions. *Acta Botanica Brasilica* 24(2): 567–570.
- Eira MTS Da, Salomão AN, Cunha R Da, Carrara DK and Mello CMC De (1994) Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze - Araucariaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 16(1): 71–75.
- Espindola LS, Noin M, Corbineau F and Côme D (1994) Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Science Research* 4: 193–201.
- Fowler JAP, Bianchetti A and Zanon A (1998) Conservação de sementes de pinheiro-do-Paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens. *Comunicado Técnico - Embrapa* 34: 1–4.
- Garcia C, Coelho CMM, Maraschin M and Oliveira LM (2014) Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. *Ciência Florestal* 24(4): 857–866.
- Guedes RS, Alves EU, da Costa EMT, Santos-Moura SDS, da Silva RDS and Cruz FRDS (2013) Avaliação do potencial fisiológico de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. *Bioscience Journal* 29(4): 859–866.
- Medeiros AC de S and Abreu DCA (2007) Desidratação ultra-rápida de embriões. *Pesquisa Florestal Brasileira* 54: 119–125.
- Oliveira LM De, Gomes JP, Souza GK, Nicoletti MF, Liz TO De and Pikart TG (2014) Metodologia Alternativa para o Teste de Tetrazólio em Sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Floresta e Ambiente* 21(4): 468–474.
- Pammenter NW and Berjak P (2013) Development of the understanding of seed recalcitrant and implications for *ex situ* conservation. *Biotechnology Vegetal* 13(3): 131–144.
- Pieruzzi FP, Dias LLC, Balbuena TS, Santa-Catarina, Claudete Santos ALW and Floh EIS (2011) Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany* 108: 337–345.
- Piriz Carrillo V, Chaves A, Fassola H and Mugridge A (2003) Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. *Seed Science and Technology* 31: 411–421.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ and Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*. Elsevier Ltd 142: 1141–1153. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>.
- Schlögl PS, Santos ALW, Vieira L do N, Floh EIS and Guerra MP (2012) Cloning and expression of embryogenesis-regulating genes in *Araucaria*

- angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Brazilian Pine). *Genetics and Molecular Biology* 35(1): 172–181.
- Vibrans AC, Sevegnani L, Uhlmann A, Schorn L a., Sobral MG, de Gasper AL, Lingner D V., Brogni E, Klemz G, Godoy MB and Verdi M (2011) Structure of mixed ombrophylous forests with *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) under external stress in Southern Brazil. *Revista de Biologia Tropical* 59(3): 1371–1387.
- Walters C (2015) Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta*. Springer Berlin Heidelberg 242: 397–406. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-015-2312-6>.
- Zechini AA, Schussler G, Silva JZ, Mattos AG, Peroni N, Mantovani A and Reis MS (2012) Produção, comercialização e identificação de variedades de pinhão no entorno da Floresta Nacional de Três Barras – SC. *Biodiversidade Brasileira* 2(2): 74–82. Available at: http://www.icmbio.gov.br/revista_eletronica/index.php/BioBR/article/view/275.

CAPÍTULO 4
RESERVE METABOLISM OF STORED AND GERMINATED
***Araucaria angustifolia* SEEDS**

Este capítulo segue a formatação da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

ARALDI, C.G.; COELHO, C.M.M. Reserve metabolism of stored and germinated *Araucaria angustifolia* seeds. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2016.

CAPÍTULO 4 – RESERVE METABOLISM OF STORED AND GERMINATED *Araucaria angustifolia* SEEDS

4.1 ABSTRACT

Reserve metabolism of *Araucaria angustifolia* seeds – Germination metabolism of recalcitrant seeds of *Araucaria angustifolia* is activated in storage, which complicates the conservation and utilization of seeds. This study aimed to identify the changes in reserve metabolites of *A. angustifolia* seeds throughout storage in order to understand the processes of hydrolysis caused by germination metabolism. Mature seeds were harvested from a natural population located in southern Brazil and stored for 90 days in natural ambient laboratory and cold chamber conditions. Due to seeds being in advanced germination in storage, they were evaluated at 90 days in different early developmental categories: I – seeds with mature embryos; II – seeds with embryos showing apparent elongation along the embryonic axis; and III – seeds with root protrusion. Contents of carbohydrates, starch, soluble and total protein, and amino acids were determined, and an electrophoretic profile of proteins performed, for embryos and megagametophytes from seeds stored for 0, 15, 30, 45 and 90 days, whereas stored germinating seeds in categories I, II, and III were evaluated only at 90 days. Higher contents of carbohydrate, protein, and amino acids were observed in embryos compared to megagametophytes, and these metabolites were decreased after onset of germination, especially in embryo tissue. Mobilization of metabolites in megagametophytes would probably increase in later stages of germination. It is suggested that such alterations are not due to deterioration of reserve components, but instead are based on seed metabolism which remains active after harvest, with hydrolysis of metabolites providing energy for germination.

Keywords: Brazilian pine, conifer, protein profile, reserve mobilization

4.2 REFERENCES

- ALFENAS AC. 1998. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 574 p.
- AMARANTE CVT, MOTA CS, MEGGUER CA AND IDE GM. 2007. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria*

- angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. *Ciência Rural* 37(2):346–351.
- AOAC. 1995. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16.ed. Washington: AOAC.
- ARALDI CG AND COELHO CMM. 2015. Establishment of post-harvest early-developmental categories for viability maintenance of *Araucaria angustifolia* seeds. *Acta Bot Brasilica* 29(4): 526–533.
- ASTARITA LV, FLOH EIS AND HANDRO W. 2004. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biol Plant* 47(1):53–59.
- AZEVEDO RA, ALAS R., SMITH RJ AND LEA PJ. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant* 104:280–292.
- BALBUENA TS, JO L, PIERUZZI FP, DIAS LLC, SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, JUNQUEIRA M, THELEN JJ, SHEVCHENKO A AND FLOH EIS. 2011. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 72(4-5):302–311.
- BALBUENA TS, SILVEIRA V, JUNQUEIRA M, DIAS, LLC, SANTA-CATARINA C, SHEVCHENKO A ND FLOH EIS. 2009. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *J Proteomics* 72(3):337–352.
- BARBEDO CJ, CENTENO DDC AND FIGUEIREDO-RIBEIRO RDCL. 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40(4):583–595.
- BERJAK P AND PAMMENTER NW. 2008. From Avicennia to Zizania: Seed recalcitrance in perspective. *Ann Bot* 101:213–228.
- BERJAK P AND PAMMENTER NW. 2013. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Front Plant Sci* 4(478):1–9.
- BEWLEY JD, BRADFORD KJ, HILHORST HWM AND NONOGAKI H. 2013. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. 3^o ed. New York – Heidelberg – Dordrecht – London: Springer.
- BIELESKI RL AND TURNER NA. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal Biochem* 17:278–293.
- BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

- principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 6 de 26 de setembro de 2008, 2008. <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>.
- CAÇOLA ÁV, AMARANTE CVT DO, FLEIG FD AND MOTA CS. 2006. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. *Ciência Florest* 16(4):391–398.
- CAPOCCHI A, MUCCILLI V, CASANI S, FOTI S, GALLESCHI L AND FONTANINI D. 2011. Proteolytic enzymes in storage protein mobilization and cell death of the megagametophyte of *Araucaria bidwillii* Hook. post-germinated seeds. *Planta* 233:817–830.
- DILLENBURG LR, ROSA LMG, MÓSENA M. 2010. Hypocotyl of seedlings of the large-seeded species *Araucaria angustifolia*: An important underground sink of the seed reserves. *Trees - Struct Funct* 24:705–711.
- DUBOIS M, GILES KA AND HAMILTON JK. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356.
- EPAGRI/CIRAM. 2014. Atlas climatológico do estado de Santa Catarina. Florianópolis, Epagri.
- FARRANT JM, PAMMENTER NW, BERJAK P. 1989. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. *Planta* 178:189–198.
- FERREIRA AG, HANDRO W. 1979. Aspects of seed germination in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Ver Bras Bot* 2:7-13.
- FOWLER JAP, BIANCHETTI A AND ZANON A. 1998. Conservação de sementes de pinheiro-do-Paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens. *Comun Técnico - Embrapa* 34:1–4.
- GARCIA C, COELHO CMM, MARASCHIN M AND OLIVEIRA LM. 2014. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. *Cienc Florest* 24(4):857–866.
- GARCIA C, SHIBATA M, COELHO CMM, SOARES FLF AND GUERRA MP. 2012. Alterações no perfil proteico em sementes de *Araucaria angustifolia* durante a maturação e sua relação com a viabilidade. *Magistra* 24(4):263–270.
- IUCN (2013) International Union for the Conservation of Nature - IUCN. Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <http://www.iucnredlist.org>

- JO L, SANTOS ALW, BUENO CA, BARBOSA HR AND FLOH EIS. 2014. Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. *Tree Physiol* 34:94-104.
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- MCCREADY RM, GUGGOLZ J, SILVIERA V AND OWENS HS. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. *Anal Chem* 22:1156-1158.
- MOREIRA-SOUZA M AND CARDOSO EJBN. 2003. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. seeds. *Sci Agric* 60(2):389-391.
- OBROUCHEVA N V, LITYAGINA S V, NOVIKOVA G V AND SIN'KEVICH I A. 2012. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination. *AoB Plants* 12:1-14.
- PAMMENTER NW AND BERJAK P. 2013. Development of the understanding of seed recalcitrant and implications for ex situ conservation. *Biotechnol Veg* 13(3):131-144.
- PANZA V, LÁINEZ V, MARODER H, PREGO I AND MALDONADO S. 2002. Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Bot J Linn Soc* 140:273-281.
- PIERUZZI FP, DIAS LLC, BALBUENA TS, SANTA-CATARINA C, SANTOS ALW AND FLOH EIS. 2011. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Ann Bot* 108:337-345.
- PIRIZ CARRILLO V, CHAVES A, FASSOLA H AND MUGRIDGE A. 2003. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. *Seed Sci Technol* 31:411-421.
- RAJJOU L, GALLARDO K, DEBEAUJON I, VANDEKERCKHOVE J, JOB C AND JOB D. 2004. The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol* 134:1598-1613.
- RAMOS A AND SOUZA GB. 1991. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. *Bol Pesqui Florest* 22/23:21-27.

- ROSADO RM, FERREIRA AG, MARIATH JE DE A AND COCUCCI AE. 1994. Amido no megagametófito de araucaria durante a germinação e desenvolvimento do esporófito. *Acta Bot Brasilica* 8(1):35–43.
- SAS. 2009. SAS Institute Inc® 2009. Cary, NC, USA, Lic. UDESC: SAS Institute Inc.
- SHIBATA M, COELHO CMM AND STEINER N. 2013. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at different stages of development. *Seed Sci Technol* 41:214–224.
- SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, BALBUENA TS, MORAES FMS, RICART CAO, SOUSA MV, GUERRA MP, HANDRO W AND FLOH E.I.S. 2008. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biol Plant* 52(1):101–104.
- WALTERS C. 2015. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242(2):397-406.
- YEMM EW AND COCKING EC. 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80(948):209-214.

CAPÍTULO 5

STORAGE ELICITS A FAST ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY IN *Araucaria angustifolia* EMBRYOS

Este capítulo segue a formatação da Revista Acta Physiologiae Plantarum.
ARALDI, C.G.; COELHO, C.M.M.; GAZIOLA, S.A.; AZEVEDO, R.A.
Storage elicits a fast antioxidant enzyme activity in *Araucaria angustifolia*
embryos. Acta Physiologiae Plantarum. 2016 (no Prelo).

CAPÍTULO 5 – STORAGE ELICITS A FAST ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY IN *Araucaria angustifolia* EMBRYOS

5.1 ABSTRACT

Storage of recalcitrant seeds leads to initiation of subcellular damage or to initiation of germination process, and both may result in viability loss. This study aimed to elucidate biochemical basis of embryos survival of *Araucaria angustifolia* recalcitrant seeds during storage. After collected, seeds were stored at ambient conditions (without temperature and humidity control) and in cold chamber (temperature of $10 \pm 3^{\circ}\text{C}$, and relative humidity of $45 \pm 5\%$), and moisture content, viability, H_2O_2 content, lipid peroxidation, protein content, and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), at 0, 15, 45 and 90 days of storage, were evaluated. Seed viability reduced about 40% during storage period accompanied by a reduction in soluble protein (about 64% of reduction) in both storage conditions, and increased lipid peroxidation (about 115% and 66% of increase for ambient and cold chamber, respectively). H_2O_2 content, used as a marker of oxidative stress was reduced during the period possibly controlled by action of CAT and APX, for which activity increases during storage were observed. Results allowed identification of seven SOD isoenzymes (one Mn-SOD, five Fe-SOD, and one Cu/Zn-SOD), whose activities also increased in response to storage. Some biochemical damage resulting from storage was observed, but viability reduction was not due to failure of enzymatic mechanisms of protection.

Keywords: Brazilian pine, recalcitrant seeds, seed conservation, reactive oxygen species, oxidative stress.

5.2 REFERENCES

- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ* 24:1337–1344
- Arruda SCC, Barbosa HS, Azevedo RA, Arruda MAS (2013) Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes. *J Proteomics* 93:107-116

- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plantarum* 85:235-241
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Phys* 50:601–639
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plantarum* 104:280–292
- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F (2008) From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Biol* 331: 806–814
- Balbuena TS, Silveira V, Junqueira M, Dias LLC, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh EIS (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *J Proteomics* 72:337-352
- Barbedo CJ, Bilia DAC (1998) Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola* 55:121-125
- Beauchamp CH, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287
- Berjak P, Pammenter NW (2013) Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Front Plant Sci* 4(478):1-9
- Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell MG, Mazzafera P, Azevedo RA (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiol Bioch* 74:165-175
- Bogdanovic J, Milosavic N, Prodanovic R, Ducic T, Radotic K (2007) Variability of antioxidant enzyme activity and isoenzyme profile in needles of Serbian spruce (*Picea omorika* (Panc.) Purkinye). *Biochem Syst Ecol* 35:263-273
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brazil (2009) Rules for seed analysis. MAPA/ACS, Brasília
- Bulbovas P, Souza SR, Esposito JBN, Moraes RM, Alves ES, Domingos M, Azevedo RA (2014) Assessment of the ozone tolerance of two soybean cultivars (*Glycine max* cv. Sambaíba and Tracajá) cultivated in Amazonian areas. *Environ Sci Pollut R* 21:10514-10524

- Cakmak I, Horst JH (1991) Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plantarum* 83:463-468
- Cembrowska-Lech D, Koprowski M, Kepczynski J (2015) Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR1 and GA3 involving the control of reactive oxygen species (H_2O_2 and $O_2^{\cdot -}$) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. *J Plant Physiol* 176: 169-179
- Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109:212-228
- Elbl P, Lira BS, Andrade SCS, Jo L, Santos ALW, Coutinho LL, Floh EIS, Rossi M (2014) Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell Tiss Org* 120:903-915
- Espíndola LS, Noin M, Corbineau F, Côme D (1994) Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. *Seed Sci Res* 4:193-201
- Epagri/Ciram (2014) Climatological atlas of Santa Catarina State. Available at: <http://www.ciram.epagri.rct-sc.br> [Accessed 15 Jan 2014]
- Farmer EE, Mueller JM (2013) ROS-Mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* 64:429-450
- Ferreira RR, Fornazier RF, Vitoria AP, Lea PJ, Azevedo RA (2002) Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *J Plant Nutr* 25:327-342
- Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Sign* 11:861-905
- Francini A, Galleschi L, Saviozzi F, Pinzino C, Izzo R, Sgherri C, Navari-Izzo F (2006) Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in recalcitrant seeds of *Araucaria bidwillii* subjected to desiccation. *Plant Physiol Bioch* 44:556-563
- Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, McPeck MA, Thomas TL, McClung CR (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* 112:327-336
- Garcia C, Coelho CMM, Maraschin M, Oliveira LM (2014) Conservation of the viability and vigor of *Araucaria angustifolia*

- (Bert.) O. Kuntze seeds during the storage. *Cienc Florest* 24:857-866
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309-314
- Gidrol X, Lin WS, Degousee N, Yip SF, Kush A (1994) Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *Eur J Biochem* 224:21-28
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48:909-930
- Gomes-Júnior RA, Moldes CA, Delite FS, Gratão PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA (2006) Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiol Bioch* 44:420-429
- Gratão PL, Monteiro CC, Antunes AM, Peres LEP, Azevedo RA (2008) Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Ann Appl Biol* 153:321-333
- Inzé D, Van Montagu M (2002) Oxidative stress in plants. Taylor & Francis, London
- IUCN (2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. [http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) [Accessed 10 Nov 2014]
- Kanematsu S, Asada K (1989) CuZn-superoxide dismutases in rice: Occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isoenzyme in leaf and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol* 30:381-391
- Kibinza S, Bazin J, Bailly C, Farrant JM, Corbineau F, El-Maarouf-Bouteau H (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Sci* 181: 309-315
- Kranter I, Roach T, Beckett RP, Whitaker C, Minibayeva FV (2010) Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *J Plant Physiol* 167:805-811
- Kraus TE, McKersie BD, Fletcher RA (1995) Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *J Plant Physiol* 145:570-576
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee DH, Lee CB (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci* 159:75-85

- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Annal Biochem* 212:540-546
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:459-481
- Moreira-Souza M, Cardoso EJBN (2003) Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Seeds. Sci Agric* 60:389-391
- Murthy UMN, Kumar PP, Sun WQ (2003) Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *J Exp Bot* 54:1057-1067
- Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Iizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K (2008) A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:3148-3162
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880
- Oliveira LM, Gomes JP, Souza GK, Nicoletti MF, Liz TO, Pikart TG (2014) Alternative methodology for the tetrazolium test in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze seeds. *Floram* 21:468-474
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J* 50:452-465
- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* 150:494-505.
- Pieruzzi FP, Dias LLC, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Santos ALW, Floh EIS (2011) Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Ann Bot* 108:337-345
- Pukacka S, Ratajczak E (2006) Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. *J Plant Physiol* 163:1259-1266

- Rendón MY, Gratão P, Salva TJG, Azevedo RA, Bragagnolo N (2013) Antioxidant enzyme activity and hydrogen peroxide content during the drying of Arabica coffee beans. *Eur Food Res Technol* 236:753-758
- Rodziejewicz P, Swarczewicz P, Chmielewska K, Wojakowska A, Stobiecki M (2014) Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol Plant* 6:1–19
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38:995-1014
- Schopfer P, Plachy C, Frahry G (2001) Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* 125:1591-1602
- Tommasi F, Paciolla C, Pinto MC, Gara L (2006) Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds. *Plant Physiol Biochem* 44:359-368
- Varghese B, Sershen, Berjak P, Varghese D, Pammenter NW (2011) Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia degeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. *Physiol Plantarum* 142:326–338
- Vitória AP, Lea PJ, Azevedo RA (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57:701-710
- Walters C (2015) Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. *Planta* 242(2):397-406
- Walters C, Berjak P, Pammenter N, Kennedy K, Raven P (2013) Preservation of recalcitrant seeds. *Science* 339:915-916
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971) Improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44:301-305
- Yang Y, Liu Q, Wang GX, Wang XD, Guo JY (2010) Germination, osmotic adjustment, and antioxidant enzyme activities of gibberellin-pretreated *Picea asperata* seeds under water stress. *New Forest* 39:231–243
- Zagorchev L, Seal CE, Kranner I, Odjakova M (2013) A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *Int J Mol Sci* 14:7405-7432

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseada no objetivo geral de conservação e valorização dos recursos genéticos, através desta pesquisa foi possível identificar a ocorrência de alterações fisiológicas e a nível de metabolismo de sementes de *A. angustifolia* após a colheita e durante o armazenamento. A conservação das sementes através do armazenamento, mantendo-se o teor de água apresentado pelas sementes na colheita/dispersão, pode ser uma alternativa para evitar danos severos ao metabolismo, mas é uma prática adequada apenas para o armazenamento a curto prazo.

A literatura indica que as sementes de *A. angustifolia* levam entre 60 e 70 dias para completar a germinação (plântulas normais), por isso a viabilidade das sementes pode ser avaliada através de métodos alternativos, como o pH do exsudato, cuja metodologia foi padronizada conforme o capítulo 1. Apesar da germinação ser lenta, por volta dos 30 dias em armazenamento hidratado, as sementes já apresentam evidências morfológicas de germinação (emissão da raiz primária), como evidenciado no capítulo 2. Por isso, acredita-se que o metabolismo germinativo tem início muito tempo antes das evidências visuais, podendo iniciar inclusive antes da colheita (ou dispersão). Estes resultados sugerem que o grau de maturação que as sementes apresentam no momento da colheita é definitivo para estabelecer a sua longevidade no armazenamento. Por isso, é muito importante que haja uma padronização do momento de coleta para que as sementes estejam no estágio maduro, o que ocorre quando se inicia a debulha natural das pinhas no campo, estas apresentam coloração marrom, e a umidade das sementes está em torno de $48\% \pm 2\%$, como foi utilizado em todo este estudo. Acredita-se que o estudo de outras procedências distintas pode auxiliar a compreensão dos aspectos relacionados ao grau de maturação das sementes. Pesquisas que busquem compreender melhor estas questões já estão sendo desenvolvidas pelo mesmo grupo de pesquisa em sementes de *A. angustifolia* da Universidade Federal de Santa Catarina (PPGRGV).

Outras pesquisas que já estão sendo desenvolvidas visam à utilização de métodos alternativos de armazenamento para sementes de *A. angustifolia*, utilizando o ABA como regulador do metabolismo germinativo e o PEG (polietilenoglicol) como regulador hídrico. A utilização destes métodos já produziu resultados positivos na ampliação do período de armazenamento de outras espécies altamente recalcitrantes.

Quanto às diferentes variedades da espécie avaliadas (*angustifolia*, *sancti josephi*, *caiova* e *indehiscens*), observou-se elevado percentual de viabilidade quando recém-colhidas (acima de 80%), mas a variedade *angustifolia* apresentou maior vigor e maior potencial de armazenamento em relação às demais, conforme demonstrado no capítulo 3. Entretanto, visando à conservação da espécie e à manutenção da diversidade genética, ressalta-se a importância da utilização de todas as variedades, seja para finalidades alimentícias ou para a produção de mudas.

Em sementes recalcitrantes, a necessidade de embebição antes do início da germinação é reduzida, e a fase I da germinação parece não ocorrer em algumas espécies. À medida que a germinação avança, as sementes se tornam mais sensíveis à perda de água e aos danos resultantes do armazenamento. Se não há disponibilidade de água adicional no substrato, este pode ser um sinal de estímulo para que a germinação ocorra e a sementes garantam a sua sobrevivência. Isto ocorreria pois a desidratação leve indica a existência de um período seco iminente, e sua consequência para o armazenamento seria aumentar as taxas metabólicas, levando ao aumento da sensibilidade à dessecação e reduzindo a longevidade das sementes no armazenamento. Como observado no capítulo 2, a germinação visível ocorreu, a princípio, em um pequeno percentual de sementes, mas aos 135 dias de armazenamento entre 40 e 50% das sementes havia atingido a fase III da germinação.

Os resultados demonstraram que diversos eventos de deterioração atuam em conjunto e podem ser observados já nos primeiros meses de armazenamento das sementes. As alterações no sistema de membranas foram evidenciadas por acréscimo na condutividade elétrica após os 135 dias de armazenamento. Mas a análise dos níveis de TBARS foi mais sensível, e detectou aumento por volta dos 45 dias de armazenamento. A peroxidação de lipídios é também uma das possíveis causas de alterações no metabolismo de lipídios, citado como importante mecanismo ligado à deterioração em sementes.

Outros componentes de reserva como açúcares solúveis e amido tiveram suas concentrações reduzidas durante o armazenamento, mas esta redução foi mais acentuada à medida que houve avanço nos estádios de germinação (capítulo 4). A redução nos teores de proteínas também foi mais evidente após o início da germinação no armazenamento de curto prazo, com redução na intensidade e número de bandas do perfil proteico. Aos 15 dias de armazenamento o teor de proteínas solúveis já havia reduzido, sendo este um componente

bioquímico eficaz para monitorar precocemente a deterioração em sementes de *A. angustifolia*. Está em andamento um projeto de pesquisa para a identificação das proteínas presentes nas bandas em que houve alterações mais evidentes, através da espectrometria de massa, a qual pode gerar resultados conclusivos sobre o metabolismo das sementes.

Outra alteração evidenciada foi o aumento no teor de aminoácidos solúveis durante o armazenamento, aparentemente sendo hidrolisados durante os estádios de germinação avaliados. A mobilização dos componentes de reserva iniciou nos embriões, sendo esta mais uma evidência de que as principais alterações observadas foram devidas ao metabolismo germinativo.

A viabilidade das sementes começou a reduzir a partir de 15 dias de armazenamento, coincidindo com o período em que foram observadas evidências do início da germinação (por volta dos 30 dias após a colheita), como mencionado acima. Em sementes recém-colhidas, o nível de H_2O_2 se apresentou elevado, o que prontamente induziu à ativação dos sistemas antioxidantes enzimáticos, refletindo em aumento das atividades da APX, CAT e SOD (capítulo 5). No período em que estas alterações ocorreram, supõe-se que já havia imposição do metabolismo germinativo, ainda que apenas embriões em EDC I tenham sido analisados. Por isso, já que as sementes de *A. angustifolia* são colhidas com plena capacidade germinativa, a presença de H_2O_2 em baixas concentrações e possivelmente outras ROS poderia atuar como sinalizadoras para os eventos metabólicos de germinação. A rápida ativação dos sistemas antioxidantes enzimáticos sugere que APX, CAT e SOD poderiam atuar como indicadores precoces da ocorrência da deterioração. A avaliação de outros marcadores de estresse oxidativo poderia dar continuidade à elucidação destes aspectos em sementes de *A. angustifolia*.

A atividade de enzimas antioxidantes parece ser outro mecanismo chave para que a germinação possa ser completada sem prejuízos mais severos como os danos à síntese de DNA e proteínas, consequências do estresse oxidativo. De fato, em estádios mais avançados do armazenamento, a atividade da SOD aumentou tanto que chegou à supressão do sistema após 120 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico, evento associado à perda total da viabilidade de embriões. Os resultados observados indicam que a manutenção da viabilidade inicial foi devida à eficiência nos processos de mobilização dos componentes e dos mecanismos enzimáticos de proteção.

Comparando-se as condições de armazenamento, não houve grandes diferenças quanto à manutenção da viabilidade, mas a condição

de câmara seca retardou o processo germinativo e a formação das plântulas. Por isso, indica-se que a utilização de temperaturas mais amenas (acima da temperatura de congelamento celular) podem ser utilizadas para reduzir o metabolismo das sementes por curto prazo durante o armazenamento. Quando as alterações morfológicas decorrentes da germinação iniciarem, as sementes devem ser imediatamente utilizadas.

Em síntese, os resultados obtidos com este trabalho indicam que as sementes de *A. angustifolia* mantêm o seu metabolismo durante os estádios de desenvolvimento e germinação. Nas sementes ortodoxas, as regulações metabólicas se baseiam em processos de quiescência ambiental, muito diferente do que ocorre com sementes recalcitrantes. Por isso, acredita-se que estudos comparativos entre o comportamento de sementes de coníferas ortodoxas e recalcitrantes podem gerar resultados favoráveis sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos ainda não elucidados sobre a fina modulação entre desenvolvimento, deterioração e germinação de sementes recalcitrantes. Inevitavelmente, as sementes morrem durante o armazenamento, mas é possível monitorar o processo de perda da viabilidade. Os conhecimentos aqui gerados e a regulação dos mecanismos identificados podem contribuir para elucidar pontos ainda incompreendidos sobre o metabolismo pós-colheita desta e de outras sementes recalcitrantes.